

EINFLUSS MEMBRANAKTIVER SUBSTANZEN AUF
DIE MORPHOLOGIE VON TRÄGER-ERYTHROZYTEN

THOMAS KIRSCHNER

1985

*Diss
München*

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand: Professor Dr.N.Zöllner

EINFLUSS MEMBRANAKTIVER SUBSTANZEN AUF DIE
MORPHOLOGIE VON TRÄGER-ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von

Thomas Kirschner

Illertissen

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privat-Dozent Dr.U.Sprandel

Mitberichterstatter: Professor Dr.N.Zöllner

Dekan: Professor Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1985

meinem

Vater und ersten Lehrer

Dr.med.Herbert Kirschner

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Material	5
2.1.1.	Erythrozyten	5
2.1.2.	Pufferlösungen	5
2.1.2.1.	Isoosmotischer Puffer I	5
2.1.2.2.	Angereicherter Puffer I ⁺	5
2.1.2.3.	Hypoosmotischer Puffer II	6
2.1.3.	Osmiumtetroxid	6
2.1.4.	Poly-L-Lysin	6
2.2.	Methoden	6
2.2.1.	Gewinnung von Träger-Erythrozyten "Reversible hypotone Dialyse"	6
2.2.2.	Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	8

2.2.2.1.	3%ige Glutaraldehydlösung	8
2.2.2.2.	1%ige Osmiumtetroxidlösung	8
2.2.2.3.	Fixierung	8
2.2.3.	Herstellen der Calcium-Lösungen	9
2.2.4.	Herstellen der Ölsäure-Lösungen	10
2.2.5.	Herstellen einer pH-Reihe von pH 6,5 - pH 8,4	11
2.3.	Nomenklatur	11
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Morphologie von Träger-Erythrozyten beim Einschluß von Calcium-Ionen	13
3.1.1.	Präparation nach Sprandel	13
3.1.2.	Abänderung der Präparation	19
3.1.2.1.	Typ-I-Träger-Erythrozyt	20
3.1.2.2.	Typ-II-Träger-Erythrozyt	22

3.2.	Einfluß freier Ölsäure auf die Morphologie von Träger-Erythrozyten und roten Blutkörperchen	27
3.2.1.	Formverhalten von Träger-Erythrozyten (Standardpräparation) beim Einschluß von Ölsäure	28
3.2.2.	Abänderung der Präparation	38
3.2.2.1.	Typ-I-Träger-Erythrozyt	38
3.2.2.2.	Typ-II-Träger-Erythrozyt	40
3.2.2.3.	Typ-III-Träger-Erythrozyt	41
3.2.3.	Formverhalten normaler roter Blut- körperchen nach 2stündiger Inkubation in Ölsäure-haltigem Medium	42
3.3.	Einfluß des pH-Wertes auf die Morphologie von Erythrozyten	46
3.4.	Kontrollversuche	53
3.4.1.	Träger-Erythrozyten ohne Einschluß	54
3.4.1.1.	Präparation unter Verwendung von Puffer I ⁺ .	54
3.4.1.2.	Präparation unter Verwendung von Puffer I .	55

3.4.2.	Typ-II-Träger-Erythrozyten ohne Einschluß ..	56
3.4.3.	Typ-I-Träger-Erythrozyten ohne Einschluß .	57
3.4.4.	Nicht lysierte Erythrozyten nach 12stündiger Inkubation in isotonischer Lösung	58
3.4.4.1.	Inkubation ohne ATP-Zusatz	58
3.4.4.2.	Inkubation in angereichertem Puffer I^+ . .	59
3.5.	Darstellung einiger typischer Artefakte .	60
4.	DISKUSSION	67
5.	ZUSAMMENFASSUNG	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83
7.	DANKSAGUNG	91
8.	LEBENS LAUF	92

1. EINLEITUNG

Bei einer Vielzahl von physiologisch und pharmakologisch wirksamen Substanzen ist das Verständnis ihres intrazellulären Verhaltens, wie z.B. der Einfluß auf membrangebundene Enzyme, das Zytoskelett oder den Membranaufbau der Zelle weitgehend unbekannt. Um Modelle zum Studium dieser Substanzen zu erhalten, versuchte man, diese in Träger-Systeme einzuschließen. Hierbei hat sich ergeben, daß sich der Erythrozyt als zellulärer Träger am besten eignet, da er biologisch abbau-
bar ist, und als körpereigene Zelle keine Immunstimulation hervorruft. Sein wesentlicher Vorteil jedoch liegt darin, daß die Morphologie als grober Parameter für den Einfluß von außen einwirkender oder eingeschlossener, membranwirksamer Substanzen dienen kann.

Eines der Einschlußverfahren solcher Substanzen in Erythrozyten ist das von Sale und Hamilton (14, 24) erstmals beschriebene und von Zimmermann (40) weiterentwickelte "Dielektrische Durchbruchverfahren". Zimmermann gelang damit der Einschluß von radioaktiv markiertem Albumin (41) und Urease (42) in Humanerythrozyten.

Ein anderes Einschluß-Prinzip beruht auf dem um die Jahrhundertwende erstmals beschriebenen Phänomen, daß Erythrozyten, die zunächst in hypoosmolare Lösungen gegeben wurden und dabei lichtmikroskopisch "unsichtbar" wurden, bei Wiederherstellen der Isoosmolarität

(z.B. durch Zugabe von Kochsalz) wieder als bikonkave Scheiten erscheinen, allerdings mit herabgesetzter Anfärbbarkeit, bedingt durch den Hämoglobinverlust während der hypoosmolaren Phase. Aufbauend auf diese Beobachtungen konnte Seeman (27) durch elektronenoptische Untersuchungen während der hypoosmolaren Phase eine Volumenzunahme der Erythrozyten, die Ausbildung kleinster "Poren" ("transient holes") in den Erythrozyten-Membranen, sowie den Austritt von Hämoglobin nachweisen. Gleichzeitig gelang Seeman der Einschluß von kolloidalem Gold. Ihler et al. (18) beschrieben den Einschluß lysosomaler Enzyme (z.B. β -Galaktosidase) in Erythrozyten, mittels dieser sogenannten "direkten reversiblen, hypotonen Hämolyse". Vorteile hierbei sind die rasche und einfache Durchführbarkeit; wesentliche Nachteile sind, daß nur sehr geringe Enzymmengen eingeschlossen werden können, und daß die so präparierten Erythrozyten große Mengen ihres Zellinhaltes verlieren. Besonders bedeutsam ist der Verlust von Hämoglobin und Glycolyse-Enzymen, was den Eigenstoffwechsel und damit die Überlebensfähigkeit (17) der Erythrozyten beeinträchtigt. Aufgrund des Hämoglobinverlustes und der damit verbundenen geringeren lichtmikroskopischen Anfärbbarkeit spricht man von "reversibel verschlossenen Erythrozytenschatten" ("resealed erythrocyte-ghosts").

Der Hämoglobinaustritt und die geringen Einschlußmengen sind durch den großen Extrazellulärraum während der hypoosmolaren Phase, etwa 10 Volumina hypotoner Lösung auf 1 Volumen Erythrozyten, bedingt. Dieses große Volumen wird einerseits benötigt, um alle Erythrozyten

zu "eröffnen", andererseits stellt es einen in Relation zum Erythrozyten-Volumen sehr großen Verteilungsraum für das freigesetzte Hämoglobin und die einzuschließende Substanz dar. Beim "Verschließen" nehmen die Erythrozyten deshalb nur einen sehr kleinen - ihrem Volumen entsprechenden - Teil der extrazellulären Flüssigkeit und der darin enthaltenen Substanz auf.

Diese Gründe veranlassten unabhängig voneinander Deloach (8) und Dale et al. (7) zur Entwicklung einer Dialyse-Methode, deren Prinzip darin besteht, den Extrazellulärraum in zwei Kompartimente zu unterteilen. Ein kleiner Teil der extrazellulären Flüssigkeit, in der die einzuschließende Substanz gelöst ist, befindet sich zusammen mit den Erythrozyten innerhalb eines Dialyse-Sackes, der für Makromoleküle impermeabel ist. Den zweiten Teil des Extrazellulär-raumes bildet zunächst ein beliebig großes Volumen hypoosmolarer Lösung, gegen die dialysiert wird, und anschließend ein ebenfalls großes Volumen einer isotonischen Lösung, mittels der die Erythrozyten wieder verschlossen werden. Der Prozentsatz der eingeschlossenen Substanzen lag ungefähr 10mal höher als bei der direkten hypotonen Hämolyse. Sprandel et al. (29 - 34) ermittelten die optimalen Präparationsbedingungen, die auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung finden (s. 2.2.1.). Da die mittels dieser "reversiblen hypotonen Dialyse" gewonnenen Erythrozyten den normalen roten Blutkörperchen in Zellinhalt - insbesondere Hämoglobin und Glycolyse-Enzyme -, Morphologie und Zellstoffwechsel sehr ähnlich sind, konnte gezeigt werden, daß diese Zellen

gleich wie normale Erythrozyten im Kreislauf zirkulieren und überleben, sodaß sie sich vorzüglich als Träger für höhermolekulare Substanzen im Kreislauf eignen. Auf Grund dieser Ergebnisse schlugen Sprandel et al. die Bezeichnung "Träger-Erythrozyten" ("carrier-erythrocytes") vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zwei membran-affine Substanzen - Calcium-Ionen und Ölsäure - mittels dieser reversiblen hypotonen Dialyse in Erythrozyten einzuschließen; in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen werden die auftretenden morphologischen Erscheinungen dokumentiert; es wird weiterhin versucht, die Morphologie als Parameter für Wirkungsweise und -ausmaß dieser beiden Substanzen zu erhalten.

Unabhängig von dem Aspekt der Membranwirksamkeit wird für den Einschluß von Calcium-Ionen und Ölsäure versucht, die von Bodemann und Passow (5) beschriebene Klassifizierung der Erythrozyten-Ghosts in Typ I, II und III auf Träger-Erythrozyten zu übertragen.

Abschließend wird der Einfluß verschiedener Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen auf die Morphologie normaler Erythrozyten dokumentiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Erythrozyten

Zur Anwendung kamen ausschließlich gewaschene Human-erythrozyten, die wie folgt gewonnen wurden:

- Zentrifugation des heparinisierten Frischblutes (100 µg Heparin auf 10 ml Blut) bei 1600g und 4° C für 15 Minuten
- Absaugen von Plasma und Leukozytensaum
- Aufschütteln des Erythrozytensedimentes in Puffer I (s. 2.1.2.1.) und anschließend 3maliges Zentrifugieren unter obengenannten Bedingungen ("Waschen" der Erythrozyten)
- Dazwischen jeweils Absaugen des Überstandes.

2.1.2. Pufferlösungen

2.1.2.1. Isoosmotischer Puffer I

Puffer I enthält 150 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat / Dikaliumhydrogenphosphat, pH 7,4.

2.1.2.2. Angereicherter Puffer I⁺

Puffer I⁺ enthält zusätzlich zu Puffer I 5 mM Glucose, 5 mM Adenosin, 1 mM Magnesiumchlorid, pH 7,4.

2.1.2.3. Hypoosmotischer Puffer II

Puffer II entspricht Puffer I ohne Natriumchlorid, pH 7,4.

2.1.3. Osmiumtetroxid

Es wurde Osmiumtetroxid - Molekulargewicht 254,2 g/Mol, Osmiumanteil 75% - der Firma Dr.Hert GmbH, München, verwendet.

2.1.4. Poly-L-Lysin

Für die elektronenmikroskopische Präparation wurde Poly-L-Lysin (P1886) der Firma Sigma, München, verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von Träger-Erythrozyten "Reversible hypotone Dialyse"

4 ml gewaschene Erythrozyten werden in einen Dialyse-Schlauch gegeben, hinzu kommt 1 ml Puffer I, der die einzuschließende Substanz enthält; im Dialyse-Schlauch resultiert ein Hämatokrit von 80%. Beim Verschließen des Dialyse-Schlauches wird eine ausreichend große Luftblase eingeschlossen (Verhältnis von Erythrozyten plus Puffer I zu Luft ca. 2 : 1), die ein besseres Durchmischen des Schlauchinhaltes gewährleisten soll. Der Dialyse-Sack wird nun an einem Glasstab befestigt und in ein 160 ml fassendes Plastik-Gefäß gegeben, das

Puffer II (hypoosmotisch) enthält. Um ein optimales Durchmischen des Sackinhaltes zu erreichen, wird das Gefäß mit 15 Umdrehungen/min bei 4°C für 60 Minuten in vertikaler Ebene rotiert.

In dieser Phase, die auch als "Lysis" bezeichnet wird, werden die Erythrozyten reversibel "eröffnet" - die in Puffer I enthaltene Substanz kann in die Erythrozyten gelangen.

Im Anschluß an die einstündige Dialyse gegen den hypoosmolaren Puffer II werden die Dialyse-Säcke in den isosmotischen Puffer I^{+} gegeben und nochmals für 1 Stunde, diesmal bei 37°C , rotiert. Der Austausch von Puffer II gegen Puffer I^{+} ermöglicht den Verschluß der Erythrozyten ("Resealing").

Nach Abschluß des Resealing wird der Inhalt des Dialyse-Sacks zentrifugiert (500g, 15 min); die so gewonnenen, sedimentierten Träger-Erythrozyten werden anschließend mindestens 4mal gewaschen (Zentrifugation bei 500g, 15 min).

In einem Teil der Kontrollexperimente wird von Anfang an Puffer I^{+} in das rotierende Gefäß gegeben, was zur Folge hat, daß keine Lysis stattfindet. Andere Kontrollversuche dienen nur der Herstellung von Träger-Erythrozyten, d.h. Puffer I, der zu Beginn den Erythrozyten zugesetzt wird, enthält keine einzuschließenden Substanzen.

2.2.2. Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Für die REM-Präparation der Erythrozyten bzw. Träger-Erythrozyten wird als erstes Fixans eine 3%ige Glutaraldehydlösung, als zweites Fixans eine 1%ige Osmiumtetroxidlösung benötigt.

2.2.2.1. 3%ige Glutaraldehydlösung

0,6 ml einer 25%igen Glutaraldehydlösung werden in eine kleine Petrischale gegeben und mit 4,4 ml einer 0,1 M Natriumcacodylatlösung, die 5% Saccharose enthält, verdünnt. Die entstehende Lösung wird auf einer Temperatur von 4° C gehalten.

2.2.2.2. 1%ige Osmiumtetroxidlösung

1,0 g kristallines Osmiumtetroxid wird in 50 ml aqua bidest. aufgelöst (ca. 10 Stunden); die entstehende 2%ige Stammlösung wird - kurz vor der Nachfixierung - mit dem gleichen Volumen einer 0,2 M Natriumcacodylatlösung versetzt.

2.2.2.3. Fixierung

Runde Deckgläschen von 10 mm bzw. 12 mm Durchmesser werden in Chromschwefelsäure gereinigt, anschließend mit aqua dest. abgespült und getrocknet. Danach wird ein dünner Film 0,25%iger Poly-L-Lysin-Lösung aufgelegt, den man wiederum trocknen läßt. Die Zellen, die zuvor in etwa 10 Volumina Puffer I aufgeschüttelt wurden, werden nun auf die so vorbereiteten Deckgläschen aufgetragen und in die vorgekühlte 3%ige Glutaraldehydlösung gebracht. Nach Ablauf einer Stunde wird der Glutaraldehyd abgesaugt, die Präparate 3mal in

4^o C-kaltem 0,1 M Natriumcacodylat gewaschen und anschließend für mindestens 12 Stunden und höchstens 24 Stunden in 0,1 M Natriumcacodylat belassen.

Die Nachfixierung erfolgt mittels eiskalter, 1%iger Osmiumtetroxidlösung für eine Stunde. Im Anschluß daran werden die Präparate 3mal mit eiskaltem aqua bidest. gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% Äthanol für je 10 Minuten) dehydriert. Abschließend wird 3mal mit 100%igem Äthanol gespült.

Nach erfolgter Goldbedampfung werden die Präparate an einem Raster-Elektronen-Mikroskop ("Cambridge Stereoscan") mit 20 kV (Vergrößerung bis 2000x) bzw. 30 kV Spannung (Vergrößerung über 2000x) betrachtet und mittels einer integrierten Kamera fotografiert (Ilford FP4, 22 DIN).

2.2.3. Herstellen der Calcium-Lösungen

Es werden Lösungen benötigt, die 0,016 mmol/l, 0,05 mmol/l, 0,2 mmol/l und 0,4 mmol/l Ca^{2+} enthalten. Sie werden aus Calciumchlorid (gepulvert), Molekulargewicht 110,99 g/Mol, der Firma Merck, Darmstadt, hergestellt.

Da die Dialyse-Schläuche für Calcium-Ionen permeabel sind, muß für ein Gleichgewicht der Ca^{2+} -Konzentration zwischen Schlauchinnenraum und dem Inhalt des Plastikgefäßes (160 ml), das den Puffer II bzw. Puffer I⁺

enthält, Sorge getragen werden; d.h. dem jeweiligen Puffer muß Ca^{2+} zugesetzt werden.

0,016 mmol/l Ca^{2+} entsprechen 1,78 mg/l Calciumchlorid, i.e. 0,36 mg/200 ml. Da sich mit der vorhandenen Analysenwaage (Mettler H31) 0,36 mg nur unzureichend genau bestimmen lassen, wird das 100fache der erforderlichen Menge abgewogen, in 200 ml des jeweiligen Puffers gelöst und anschließend auf 1/100 verdünnt. Die anderen Konzentrationen erhält man entsprechend.

2.2.4. Herstellen der Ölsäure-Lösungen

Es werden Lösungen benötigt, die 0,33 mmol/l, 0,033 mmol/l, 3,3 $\mu\text{mol/l}$ und 0,33 $\mu\text{mol/l}$ Ölsäure enthalten. Um die eigenen Ergebnisse mit denen von Rumsby (23) vergleichen zu können, wird nach seinen Angaben eine 0,33 mM Ölsäure-Lösung hergestellt, anschließend allerdings zusätzlich für 3 Minuten bei 50 Watt ultrabeschallt. Ölsäure hat ein Molekulargewicht von 282,5 g/Mol, 0,33 mM entsprechen also 94,2 mg/l. Um der Genauigkeit der Analysenwaage Rechnung zu tragen, werden 18,8 mg Ölsäure abgewogen, in 200 ml des 0,25% Äthanol enthaltenden Puffer I "gelöst" und dann beschallt.

Um auch in diesen Versuchen eine Diffusion der einzuschließenden Substanz (Ölsäure) aus dem Dialyse-Sack heraus zu verhindern, enthalten die Puffer II bzw. I⁺ die entsprechende Konzentration Ölsäure.

Die weiteren benötigten Konzentrationen werden aus dem obigen Ansatz durch jeweilige Verdünnung auf 1/10 gewonnen.

2.2.5. Herstellen einer pH-Reihe von pH 6,5 - pH 8,4
Bei diesem Versuch enthält Puffer I, der den Erythrozyten in den Dialyse-Schlauch zugegeben wird, keine einzuschließende Substanz; der Dialyse-Sack wird für 2 Stunden bei 37° C in Puffer I⁺, innerhalb eines Plastik-Gefäßes (160 ml), rotiert. Das Einstellen des jeweiligen pH-Wertes von Puffer I⁺, der vorher auf 37° C erwärmt wurde, erfolgt mittels 1 N Salzsäure für Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen kleiner pH 7,4 (i.e. maximal ca. 1,2 ml Salzsäure); für pH-Werte größer 7,4 wird 1 N Natronlauge verwendet.

2.3. Nomenklatur

Bei der Benennung der einzelnen Träger-Erythrozyten-Formen findet die Nomenklatur von Bessis aus dem Jahre 1972 (2) für Erythrozyten Anwendung. Im folgenden werden bezeichnet als:

Discozyten: normal geformte, bikonkave Träger-Erythrozyten

Codozyten: hypochrome, uni- oder bikonkave Träger-Erythrozyten mit herabgesetztem Zellvolumen

Echinozyten I: Discozyten mit unregelmäßig konturier-tem Rand

Echinozyten II: Zellen, die als flache Scheiben imponieren, keine zentralen Einziehungen mehr besitzen und bereits einige Spicules aufweisen

Echinozyten III: runde oder ovale Zellen, deren Oberfläche gleichmäßig mit 30 - 50 Spicules besetzt ist

Stomatozyten: unikonkave Zellen mit tiefer zentraler Einziehung, die im Unterschied zu Codozyten ein normales Zellvolumen aufweisen

Akantozyten: unregelmäßig geformte Zellen mit ungeordneten, ungleich langen und ungleich dicken Spicules

Sphärozyten: kugelförmige Zellen, ohne Oberflächenstruktur.

3. ERGEBNISSE

3.1. Morphologie von Träger-Erythrozyten beim Einschluß von Calcium-Ionen

3.1.1. Präparation nach Sprandel et al.

Der Einfluß intrazellulärer Calcium-Ionen auf die äußere Form von Erythrozyten ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen (11, 19, 38, 39). Die Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen wurde in diesen Arbeiten auf sehr unterschiedliche Weisen erhöht; gemeinsames morphologisches Ergebnis ist eine Abnahme normal geformter Discozyten, verbunden mit einer Zunahme von Echinozyten und Mikro-Sphärozyten, die die Endform einer durch Erhöhung der Ca_i^{2+} -Konzentration ausgelösten morphologischen Veränderung normaler roter Blutkörperchen darstellen.

Im folgenden wird die Ca_i^{2+} -Konzentration mittels der - unter 2.1.1. beschriebenen Methode der - reversiblen hypotonen Dialyse erhöht, indem den Erythrozyten während der Lysis die jeweils einzuschließende Calcium-Konzentration "angeboten" wird. Untersucht wird das Formverhalten der Träger-Erythrozyten bei 4 verschiedenen Konzentrationen: ausgehend von der physiologischen Ca_i^{2+} -Konzentration von 0,016 mmol/l (20), über 0,05 mmol/l und 0,2 mmol/l bis 0,4 mmol/l.

Abbildung 1 zeigt Träger-Erythrozyten, in die die physiologische Calcium-Konzentration von 0,016 mmol/l "eingeschlossen" wurde. Es finden sich überwiegend

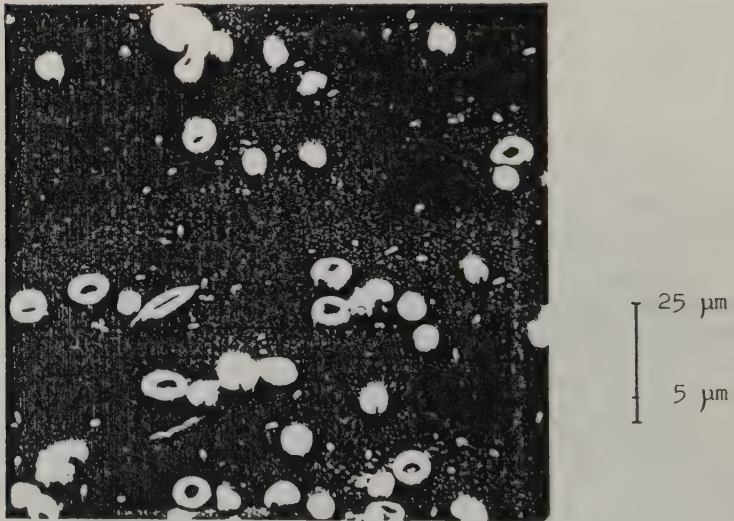


Abb.1: "Einschluß": 0,016 mmol/l Ca^{2+} (Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde)

Discozyten mit einem Durchmesser von 7,5 μm , die allerdings zum Teil bereits tiefe zentrale Einziehungen (Übergang des Discozyten zum Codozyten) haben; dieses Phänomen dürfte auf die Präparation zurückzuführen sein (geringer Hämoglobin-Verlust), da es auch in den Kontrollversuchen zu beobachten ist (s. 3.4.7.).

Vereinzelte sind auch Stomatozyten (sog. "cup-shaped-cells") und Sphärozyten zu sehen; insgesamt besteht kein Unterschied zu den Kontrollversuchen.

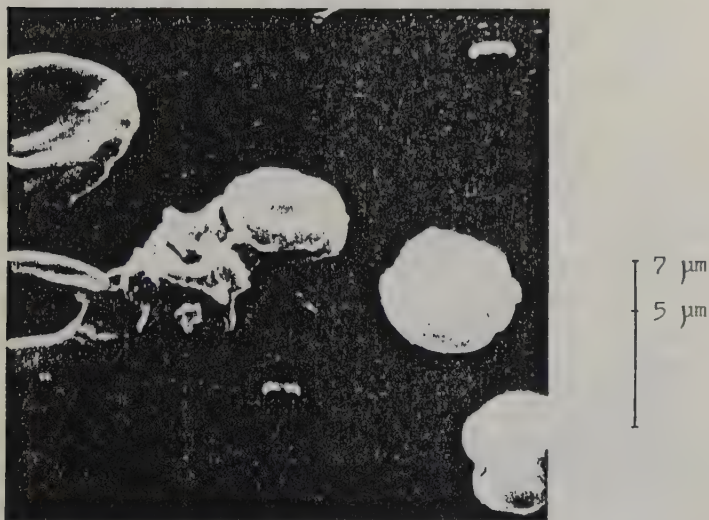


Abb.2: Discozyt (li. oben), Codozyt (li. Mitte),
Stomatozyt (re.), Echinozyt III; Einschluß und
Präp. siehe Abb.1

Einen nicht typischen Ausschnitt aus Abbildung 1 stellt Abbildung 2 dar: sie zeigt die beiden - bereits von Deuticke et al. (9) für normale Erythrozyten beschriebenen - möglichen Übergänge des Träger-Erythrozyten

vom Discozyten (Durchmesser ca. 7 μm) zum einen zum Echinozyten, zum anderen zum Stomatozyten mit jeweils verringertem Durchmesser (ca. 5 μm). Die gemeinsame Endform dieser beiden "Transformationssequenzen" (Deuticke), der Mikro-Sphärozyt, ist auf diesem Ausschnitt nicht enthalten (s. a. Abb.4). Am linken Bildrand ist eine hypochrome Zelle (Codozyt) zu erkennen.

Ebenso wie die Kontrollversuche lassen die Abbildungen 1 und 2 bereits erkennen, daß morphologische Alterationen von Träger-Erythrozyten nicht nur auf den Ein-schluß einer membranaktiven Substanz zurückzuführen sind, sondern in geringem Maße auch durch andere Ein-flüsse wie Waschen und Zentrifugieren der Zellen, sowie die spezifische Präparation der Träger-Erythrozyten bedingt sein können.

Erhöht man die eingeschlossene Calcium-Konzentration auf das 3fache der physiologischen Innen-Konzentration (i.e. 0,05 mmol/l), findet man nur noch vereinzelt Discozyten und einige Sphärozyten; die vorherrschende Zellform ist der Stomatozyt (Abbildung 3). Diese Zellen besitzen einen mittleren Durchmesser von 5,5 μm bis 6 μm und sind damit etwas größer als die Sphärozyten, die bei weitere Konzentrationserhöhung (s. u.) ent-stehen.



Abb.3: Stomatozyten; Einschluß: $0,05 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$;
(Präp.: $0^\circ / 37^\circ$ für je 1 Stunde)

Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration, in diesem Falle auf das 12fache der normalen Ca_i^{2+} -Konzentration (i.e. $0,2 \text{ mmol/l}$), erscheinen fast ausschließlich glattberandete Sphärozyten mit einem Durchmesser von ca. $5 \mu\text{m}$ (Abbildung 4). Es sind nur noch wenige bikonkave Zellen, sowie einige Stomatozyten zu erkennen.

Das Bild einer ausgeprägten Mikro-Sphärozytose, das Abbildung 4 zeigt, ändert sich bei nochmaliger Erhöhung der eingeschlossenen Konzentration nicht (z.B. $0,4 \text{ mM}$,

i.e. die 25fache physiologische Ca_i^{2+} -Konzentration des Erythrozyten). Es finden sich gleichmäßig konturierte,

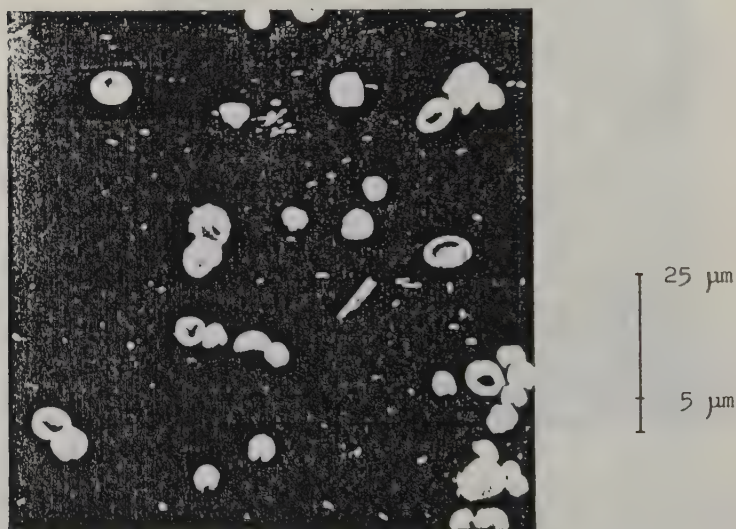


Abb.4: Sphärozyten; Einschluß: $0,2 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$;
(Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde)

runde Zellen, die zum Teil als Restzustand des Stomatocyten noch eine kleine Einziehung aufweisen. Im Gegensatz hierzu steht die unter Abänderung der üblichen Präparationsmethoden (Lysis 0° , Resealing 0° für je 1 Stunde) entstehende "multikonkave" Zelle (siehe 3.1.2.1.).

Zusammenfassend ergibt sich aus dem vorstehenden Abschnitt, daß Calcium-Ionen als membranaktive Substanz Formveränderungen an roten Blutzellen bewirken, sofern sich ihre intrazelluläre Konzentration erhöht. Im Gegensatz zu anderen Autoren durchlaufen die Erythrozyten unter den beschriebenen Präparationsbedingungen (2.2.1.) eine Stomatozytose, an deren Ende jedoch auch die "micro-sphered-cell" steht.

3.1.2. Abänderung der Präparation

Bodemann und Passow (5) postulierten für - mittels der direkten reversiblen, hypotonen Hämolyse gewonnenen - Erythrozyten-Ghosts 3 verschiedene Typen, die sich biochemisch (auf Grund ihres Permeabilitätsverhaltens für Ionen und Makromoleküle) und morphologisch unterscheiden lassen. Sie beschrieben einen Typ-I-Ghost, der sich bereits im hypoosmolaren Milieu bei 0° C wieder verschließt, einen Typ-III-Ghost, der unter isoosmotischen Bedingungen und erhöhter Temperatur entsteht und einen Typ-II-Ghost, der sich nach einstündiger Inkubation bei 37° C aus Typ III entwickelt.

Im folgenden Abschnitt wird versucht, die Typisierung der Erythrozyten-Ghosts auf Träger-Erythrozyten zu übertragen. Da es sich bei der reversiblen hypotonen Dialyse um ein wesentlich schonenderes, dafür aber länger dauerndes Verfahren zum Einschluß von Substanzen in Erythrozyten handelt (einstündige Lysis bzw. einstündiges Resealing gegenüber den höchstens einige Minuten dauernden entsprechenden Vorgängen bei der

direkten Dialyse), wird zur Herstellung eines "Typ-I-Träger-Erythrozyten" 1 Stunde bei 0°C lysiert und anschließend ebenfalls für 1 Stunde bei 0°C wieder verschlossen. Der "Typ-III-Träger-Erythrozyt" entspricht den bei der Standardpräparation gewonnenen Zellen (s. 3.1.1.), den Typ II erhält man durch 12stündiges Re-sealing bei 37°C .

Bei der Herstellung der Typ-I- und Typ-II-Träger-Erythrozyten wird als einzuschließende Substanz Ca^{2+} in einer Konzentration von $0,05\text{ mmol/l}$, also etwa das 3fache der physiologischen Ca_i^{2+} -Konzentration, angeboten.

3.1.2.1. Typ-I-Träger-Erythrozyt

Unter diesen Präparationsbedingungen - Lysis 0°C , Re-sealing 0°C , je 1 Stunde - kommt es zu einem deutlich unvollständigerem Verschluß der Träger-Erythrozyten; Ausdruck hierfür ist die Tatsache, daß 6maliges Waschen der präparierten Zellen notwendig war. Nach dem ersten Waschvorgang sedimentiert der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wie in Abbildung 5 dargestellt. Die in dieser Abbildung als "Hämolysat" bezeichnete Schicht enthält das während des Re-sealing nicht wieder eingeschlossene Hämoglobin; sie ist beim Verschluß bei 0°C deutlich stärker rot gefärbt. Die Ausbeute der Träger-Erythrozyten beträgt ca. ein Viertel der Ausbeute bei Re-sealing unter Standard-Präparationsbedingungen. Jedoch zeigen die Typ-I-Zellen im ungefärbten lichtmikroskopischen Präparat keine erhöhte Transparenz gegenüber den Typ-III-Zellen.

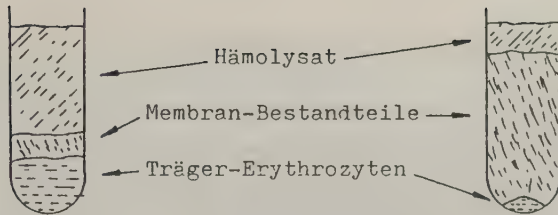


Abb.5: Vergleich zweier Zentrifugenröhrchen nach dem ersten Waschvorgang bei Resealing unter 37° C (li.) und 0° C (re.)



Abb.6: Typ-I-Träger-Erythrozyt: "multikonkave Zelle";
Einschluß: 0,05 mmol/l Ca^{2+} (Präp.: 0° / 0°
für je 1 Stunde)

Im REM-Präparat findet man vereinzelt Discozyten und glattberandete Sphärozyten; die vorherrschende Zellform ist jedoch die "multikonkave Zelle", die anteilmäßig ca. 60% bis 70% ausmacht und einen mittleren Durchmesser von 5 μm aufweist (Abbildung 6).

3.1.2.2. Typ-II-Träger-Erythrozyt

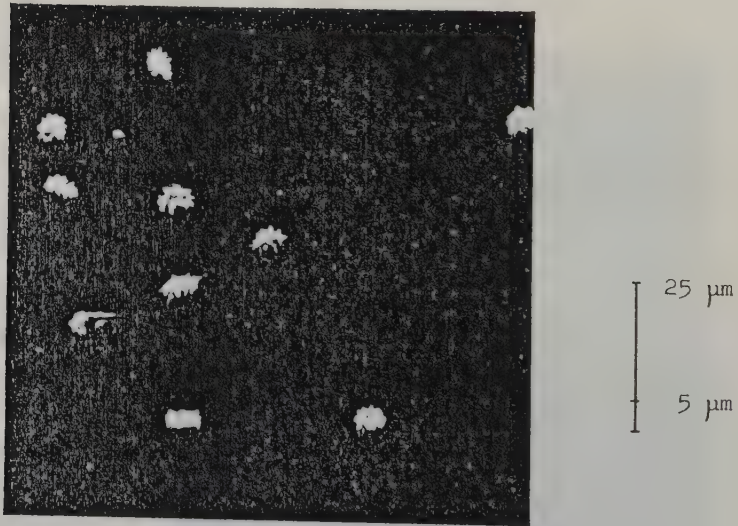


Abb.7: Echinozyten II und III; Träger-Erythrozyten
ohne Einschluß nach 12stündigem Resealing

Der Typ II entsteht aus Typ-III-Träger-Erythrozyten, die für 12 Stunden in isoosmotischem Puffer verschlos-

sen wurden. Da im gegebenen Fall Calcium-Ionen eingeschlossen werden, rote Blutkörperchen jedoch eine ATP-abhängige Calcium-Magnesium-Pumpe besitzen (26), muß davon ausgegangen werden, daß die Träger-Erythrozyten unter Bereitstellung von Energie in Form von Puffer I^+ beim Resealing große Mengen des eingeschlossenen Ca^{2+} wieder aus der Zelle "herauspumpen".

Um dies zu verhindern, enthält der isoosmotische Puffer in diesem Versuch keine Zusätze; dies erfordert jedoch einen Kontrollversuch, bei dem Träger-Erythrozyten ohne Einschluß ohne ATP-Zusatz für 12 Stunden verschlossen werden. Das Ergebnis dieses Kontrollversuches zeigt Abbildung 7: Echinozyten II und III mit einem Durchmesser bis zu 5 μm , wie sie auch von anderen Autoren unter ATP-Mangel beschrieben werden (11, 19).

Beim Einschluß von 0,05 mmol/l Ca^{2+} in Typ-II-Träger-Erythrozyten (Abbildung 8) nehmen die Echinozyten anteilmäßig ab, während glattberandete Sphärozyten (mit einem mittleren Durchmesser von 5 μm), wie sie auch bei Typ-III-Träger-Erythrozyten mit hohen eingeschlossenen Calcium-Konzentrationen (Abbildung 4) gefunden werden, zahlenmäßig zunehmen.

Einen indirekten Nachweis für die Existenz einer Calcium-Pumpe liefert ein weiterer Kontrollversuch: nicht lysierte rote Blutkörperchen werden für 1 Stunde, zunächst bei 0° C, dann bei 37° C in Puffer I^+ inkubiert, der eine Ca^{2+} -Konzentration von 8,0 mmol/l - also



Abb.8: Typ-II-Träger-Erythrozyten: glattberandete Sphärozyten; am rechten Bildrand: Konglomerat von Membranbestandteilen; Echinozyten II und III
Einschluß: 0,05 mmol/l Ca^{2+} (Präp.: 0° / 37° für 1 bzw. 12 Stunden)

ca. die 3fache physiologische Serum-Konzentration - enthält. Unter diesen Bedingungen finden sich überwiegend Discozyten (70%) mit einem Durchmesser von 7 μm , vereinzelt auch Echinozyten und Sphärozyten (Abbildung 9). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat von Weed und Chailley (37) überein, die für eine Calcium-

Konzentration von 10 mmol/l im Außenmedium erst nach 3 Stunden eine beginnende Echinozytose beschreiben.

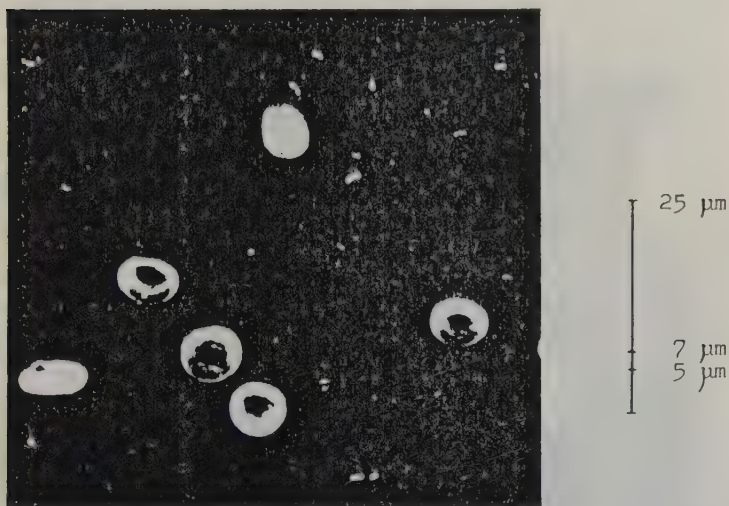


Abb.9: nicht lysierte Erythrocyten nach 2stündiger Inkubation in 8 mM Calcium-Lösung (Puffer I^+)

Aufgrund des großen Konzentrationsgefälles (500 : 1 extra- zu intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration) und der Tatsache, daß die Erythrozytenmembran für Calcium-Ionen permeabel ist, muß ein aktiver Transport aus dem Erythrozyten heraus erfolgen.

In Ergänzung zu Abbildung 2 zeigt Abbildung 10 eine weitere Träger-Erythrozyten-Form, die - ebenso wie bei normalen roten Blutkörperchen - während der "discocyte-spherocyte-transformation" (21) beobachtet wird.



Abb.10: Träger-Erythrozyten ohne Einschluß nach 12-stündigem Resealing in Puffer I⁺

Es handelt sich in diesem Fall um Träger-Erythrozyten ohne Einschluß, die 12 Stunden lang verschlossen wurden. In der Bildmitte liegen ein Echinozyt II und III, am linken Bildrand ist ein Echino-Sphärozyt angeschnitten. Diese Zellform stellt ein Intermediärstadium zwischen dem Echinozyten III und dem Sphärozyten dar.

Für den Versuch, die von Bodemann und Passow (5) bei Erythrozyten-Ghosts beschriebenen Typen I, II und III auf Träger-Erythrozyten zu übertragen, gilt zusammenfassend (beim Einschluß von $0,05 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$):

- Nach einstündigem Resealing bei 0° C resultieren im wesentlichen multikorkave Zellen: Typ I (Abb.6)
- Nach einstündigem Resealing bei 37° C findet man Stomatozyten: Typ III (Abb.3)
- Nach 12stündigem Resealing bei 37° C entstehen glattberandete Sphärozyten: Typ II (Abb.8).

3.2. Einfluß von freier Ölsäure auf die Morphologie von Träger-Erythrozyten und roten Blutkörperchen

Bereits Deuticke et al. (9), Weed et al. (37), sowie Rumsby (23) haben auf die Bedeutung der Ölsäure in Bezug auf das Formverhalten roter Blutkörperchen hingewiesen. Diese Autoren beschreiben in ihren Ergebnissen die Ölsäure als eine hochwirksame, eine Echinozytose auslösende Substanz. Als benötigte Mindestkonzentration nennen Deuticke et al. $50 \text{ } \mu\text{mol/l}$, Rumsby untersuchte die Morphologie bei $0,5 \text{ mmol/l}$ und 2 mmol/l , wobei in beiden Untersuchungen die Ölsäure von außen auf die Erythrozyten einwirkte. Im folgenden werden zunächst vier verschiedene Konzentrationen freier, d.h. nicht wie im Plasma an Albumin gebundener

oder veresteter Ölsäure - $0,33 \text{ mmol/l}$ als Ausgangskonzentration, $0,033 \text{ mmol/l}$, $3,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$ und $0,33 \text{ } \mu\text{mol/l}$ - in Erythrozyten eingeschlossen, also der intrazelluläre Einfluß dieser membranaktiven Substanz auf die Morphologie von Erythrozyten dokumentiert. Anschließend werden dieselben Konzentrationen Ölsäure nicht eingeschlossen, sondern die Erythrozyten lediglich für zwei Stunden in Lösungen, die die jeweilige Konzentration Ölsäure enthalten, inkubiert und den Einschluß-Präparaten gegenübergestellt.

3.2.1. Formverhalten von Träger-Erythrozyten (Standardpräparation) beim Einschluß von Ölsäure

Abbildung 11 zeigt Träger-Erythrozyten, denen während der Lysis $0,33 \text{ mmol/l}$ Ölsäure angeboten wurde. Links am Bildrand ist ein Echinozyt III mit $6 \text{ } \mu\text{m}$ Durchmesser zu erkennen, rechts oben ein Echino-Sphärozyt. Bei der Struktur rechts unten handelt es sich um ein Konglomerat von Membranbestandteilen. Nach dem Resealing war in diesem Versuch eine starke Hämolyse zu beobachten, so daß selbst 7maliges Waschen (gegenüber 3maligem Waschen bei Träger-Erythrozyten-Präparationen ohne Einschluß) die Verunreinigungen des REM-Präparates nicht verhindern konnte; insbesondere am oberen Bildrand sind fadenartige Strukturen zu erkennen, die Eiweißen (Hämoglobin) entsprechen.



Abb. 11: Massive Echinozytose und Verunreinigungen:
Einschluß: 0,33 mmol/l Ölsäure (Präp.: 0° / 37°
für je 1 Stunde)

Beim Einschluß von 0,033 mmol/l - i.e. 1/10 der Ausgangskonzentration - erhält man keinen qualitativen oder quantitativen Unterschied zu dem vorhergehenden Präparat. Es zeigt - neben den bereits in Abbildung 11 erwähnten Verunreinigungen - im wesentlichen Echinozyten III mit einem mittleren Durchmesser von 5,5 µm.

Vereinzelt erkennt man Echino-Sphärozyten , zum Teil auch Echinozyten II (Abbildung 12).



Abb.12: Echinozyten II und III; Einschluß: 0,033 mmol/l
(Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde)

Eine weitere Reduktion der eingeschlossenen Ölsäure-Konzentration auf 1/100 der Ausgangskonzentration - i.e. 3,3 µmol/l - ergibt eine deutliche Abnahme der Echinozyten III und II, verbunden mit einer Zunahme bikonkav geformter Träger-Erythrozyten, die zum einen eine tiefe zentrale Einziehung besitzen und zum andern

eine unrunde Berandung aufweisen: Echino-Codozyten (Abbildung 13); ihr Durchmesser beträgt ca. 6 μm . Nur vereinzelt sind noch (wie am unteren Bildrand) Echinozyten III zu finden.

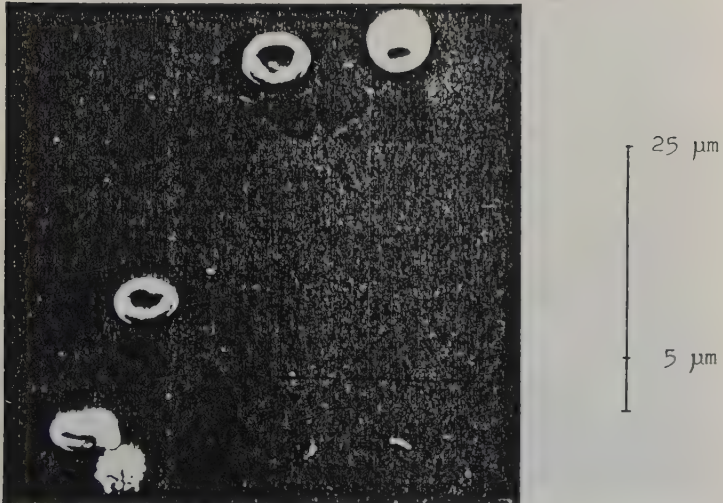


Abb.13: Echinc-Codozyten; Einschluß: 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Ölsäure
(Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde)

Die in Abbildung 13 beschriebenen tiefen zentralen Einziehungen der Träger-Erythrozyten verschwinden bei nochmaliger Verringerung der eingeschlossenen Ölsäurekonzentration um 1/10 auf 0,33 $\mu\text{mol/l}$. Es kommt zu einer

deutlicheren Betonung der unrunder Berandung der Zellen (Abbildung 14). Diese Formvariante beschreiben Bessis und Weed (3) als erste Stufe der Echinozytose,

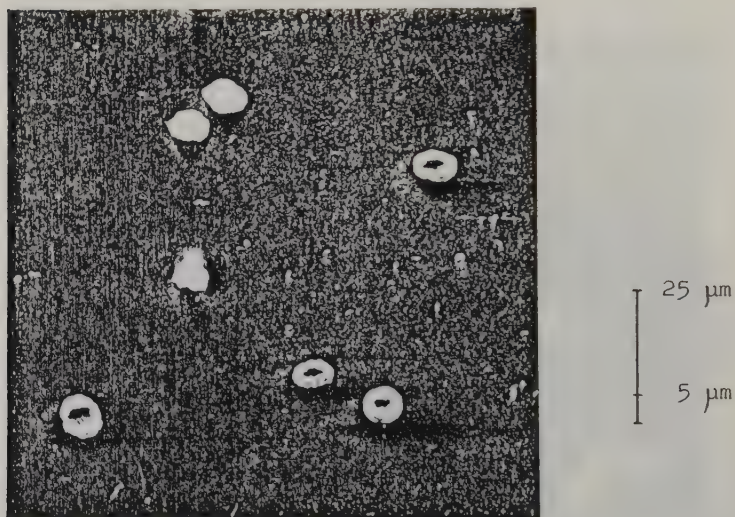


Abb.14: Echinozyten I; Einschluß: $0,33 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure
(Präp.: $0^\circ / 37^\circ$ für je 1 Stunde)

da es sich bei den "Aussackungen" um Frühstadien der Spicules eines Echinozyten II bzw. III handelt. Morphologisches Ergebnis eines Ölsäure-Einschlusses von $0,33 \mu\text{mol/l}$ sind also Echinozyten I; andere Zellformen werden nicht beobachtet. Mit Abnahme der eingeschlossenen Ölsäure-Konzentration kommt es zu einer Abnahme

der Hämolyse während des Resealing, sodaß bei den letzten beiden Versuchen bezüglich des Hämolyse-Grades kein Unterschied zu den Kontrollversuchen (s. 3.4.) besteht.

Die Abbildungen 15 bis 21 zeigen nochmals die aufeinanderfolgenden Stadien der Echinozytose, die Träger-Erythrozyten durchlaufen, wenn steigende Konzentrationen freier und damit membranaffiner Ölsäure eingeschlossen werden.

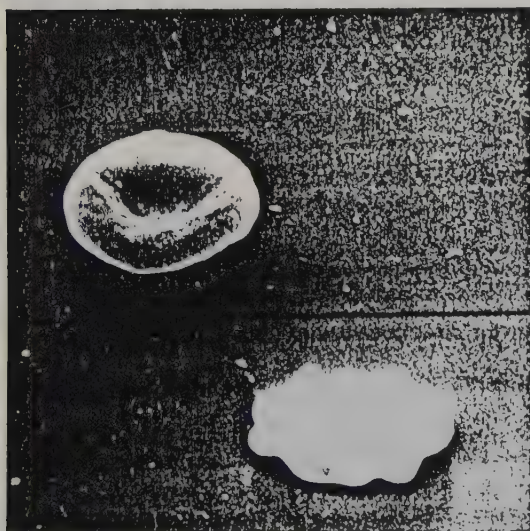


Abb. 15



Abb. 16

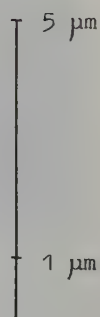


Abb. 17

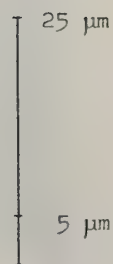
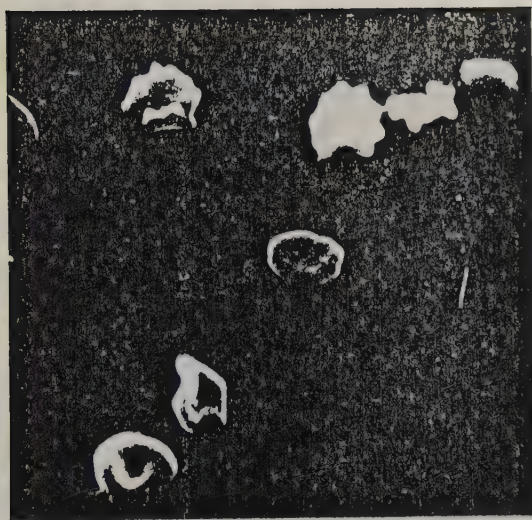


Abb. 18

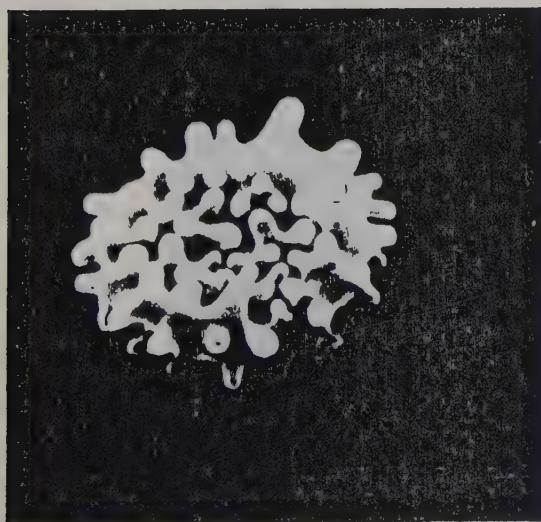


Abb. 19



Abb. 20



Abb. 21

Seite 33:

- Abb.15: Discozyt und Echinozyt I, beide mit einem Durchmesser von 7 μm

Seite 34:

- Abb.16: Echinozyt I, Durchmesser 7 μm
- Abb.17: Übergangsform vom Echinozyten I zum Echinozyten II

Seite 35:

- Abb.18: insbesondere am oberen Bildrand Echinozyten II Durchmesser ca. 7 μm
- Abb.19: Echinozyt III, dessen mittlerer Durchmesser 6 μm beträgt

Seite 36:

- Abb.20: die drei Stadien der Echinozytose in einem Bild: Echinozyt I (oben), Echinozyten II (Mitte), Echinozyt III (li. unten); es handelt sich hierbei um keinen typischen Ausschnitt bei einer bestimmten Konzentration
- Abb.21: Akantozyt mit einem mittleren Durchmesser von 6 μm

Die in Abbildung 21 gezeigte Zellform, der Akantozyt - i.e. ein (Träger-)Erythrozyt mit unregelmäßig angeordneten, ungleich langen und ungleich dicken Spicules -, stellt kein typisches Glied in der Transformationssequenz des Discozyten zum Echinozyten bzw. Mikro-Sphärozyten dar (2), wird aber insbesondere bei hohen eingeschlossenen Ölsäure-Konzentrationen häufiger beobachtet.

Die von anderen Autoren (2, 9) beschriebene Endform - der auf den vorhergehenden Seiten abgebildeten Transformationssequenz -, der Mikro-Sphärozyt, kommt in der unter 2.2.1. bezeichneten Versuchsanordnung nicht zur Darstellung; beim Einschluß höherer Konzentrationen, z.B. 0,07 mmol/l Ölsäure, i.e. das 2fache der Ausgangskonzentration, kommt es zu einer vollständigen Hämolyse, sodaß es nicht gelingt, Träger-Erythrozyten für die REM-Präparation zu gewinnen.

3.2.2. Abänderung der Präparation zur Gewinnung von Typ-I- und Typ-II-Träger-Erythrozyten (s. a. 3.1.2.)

Bei der Herstellung dieser beiden Typen wird den Zellen während der Lysis als einzuschließende Substanz Ölsäure in einer Konzentration von 33 μ mol/l, i.e. 1/10 der Ausgangskonzentration, angeboten.

3.2.2.1. Typ-I-Träger-Erythrozyt

Abbildung 22 zeigt Zellen, die für jeweils 1 Stunde bei

0° C lysiert und ebenfalls bei 0° C wieder verschlossen wurden: Typ-I-Träger-Erythrozyten. Es finden sich neben

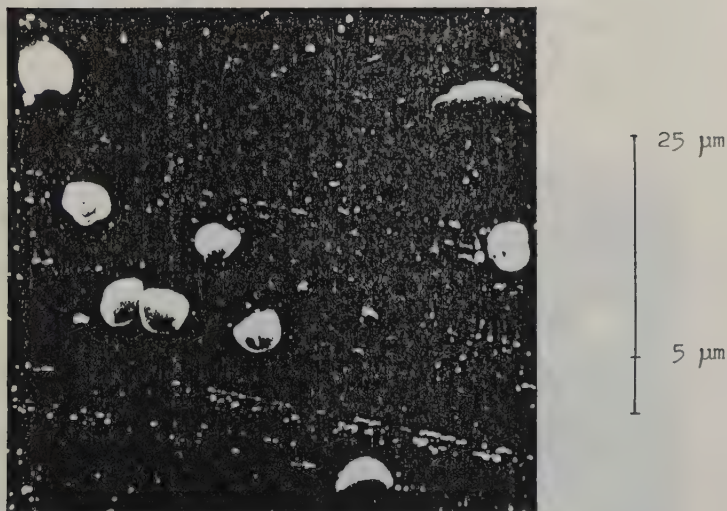


Abb.22: Typ-I-Träger-Erythrozyten; Verunreinigungen;
Einschluß: 33 $\mu\text{mol/l}$ Ölsäure (Fräp.: 0° / 0°
für je 1 Stunde)

starken Verunreinigungen (aufgrund einer ausgeprägten Hämolyse war 7maliges Waschen notwendig) überwiegend glattberandete Sphärozyten, die jedoch häufig eine bis drei, nicht sehr tiefe Einziehungen aufweisen. Bessis et al. (3) beschreiben diese vereinzelt Einziehungen als typische Artefakte, die während der REM-Präparation

auftreten (im Gegensatz zur multikonkaven Zelle: s. a. 3.1.2.1.), sodaß sich als Typ-I-Träger-Erythrozyt beim Einschluß von $33 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure der glattberandete Sphärozyt mit einem Durchmesser von ca. $5 \mu\text{m}$ ergibt.

3.2.2.2. Typ-II-Träger-Erythrozyt

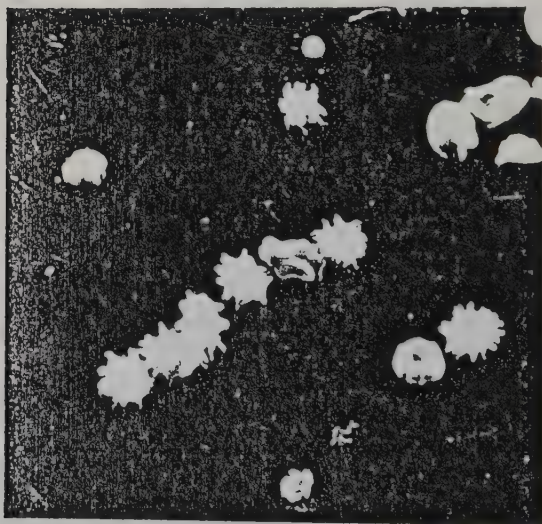


Abb. 23: Typ-II-Träger-Erythrozyten; Einschluß: $33 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure (Präp.: 0° / 37° für 1 bzw. 12 Stunden)

Nach einstündiger Lysis bei 0°C und 12stündigem Re-sealing bei 37°C entsteht der Typ-II-Träger-Erythrozyt: Abbildung 23. Es handelt sich fast ausschließlich

um Echinozyten III, mit einem mittleren Durchmesser von $6,5 \mu\text{m}$ (s. a. Typ-II-Träger-Erythrozyt beim Einschluß von Ca^{2+} : glattberandeter Sphärozyt); nur vereinzelt erkennt man Echinozyten II bzw. I. Auffallend an den Typ-III-Echinozyten ist die Anzahl der Spicules: Sie ist geringer als beim Einschluß der gleichen Konzentration Ölsäure unter Standardbedingungen: siehe Abbildungen 12 und 19.

3.2.2.3. Typ-III-Träger-Erythrozyt

Hierbei handelt es sich um die unter Standardbedingungen - Lysis 0°C , Resealing 37°C für je 1 Stunde - gewonnenen Zellen (Abbildung 12).

Zusammenfassend ergibt sich (beim Einschluß von $33 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure):

- Nach einstündigem Resealing bei 0°C entstehen im wesentlichen glattberandete Sphärozyten: Typ I (Abbildung 22)
- Nach einstündigem Resealing bei 37°C findet man fast ausschließlich Echinozyten III mit zahlreichen Spicules: Typ III (Abbildung 12)
- Nach 12stündigem Resealing bei 37°C resultieren ebenfalls Echinozyten III, jedoch mit deutlich weniger Spicules als nach einstündigem Resealing: Typ II (Abbildung 23).

3.2.3. Formverhalten normaler roter Blutkörperchen nach 2stündiger Inkubation in Ölsäure-haltigem Medium

In dieser Versuchsreihe wird die Ölsäure nicht in die Erythrozyten eingeschlossen, sondern der Einfluß von außen auf die Erythrozyten einwirkender Ölsäure untersucht. Um eine Vergleichsmöglichkeit mit den Einschluß-Präparaten zu gewinnen, werden die gleichen Konzentrationen gewählt; aus demselben Grund werden die Zellen jeweils für 1 Stunde in Puffer I^+ zunächst bei $0^{\circ} C$, dann bei $37^{\circ} C$ inkubiert.

Nach 2stündiger Inkubation in $0,33 \text{ mmol/l}$ Ölsäure-haltigem Puffer I^+ finden sich im wesentlichen Echinozyten III, deren Durchmesser im Mittel $4,5$ bis $5 \mu m$ beträgt (ohne Abbildung); nach Ablauf der 2 Stunden konnte eine mittelgradige Hämolyse beobachtet werden, die geringer als beim Einschluß der gleichen Konzentration war und nur 4maliges Waschen erforderte.

Eine deutliche Abnahme der Echinozyten III, verbunden mit einer Zunahme der Echinozyten I und bikonkaver Zellen ergibt sich bei Reduktion der Ölsäure-Konzentration auf $0,033 \text{ mmol/l}$ im Außenmedium (Abbildung 24): ca. 50% Echinozyten III - gegenüber 90% im vorhergehenden Präparat - mit einem mittleren Durchmesser von $5 \mu m$; die restlichen 50% der Zellen lassen noch eine bikonkave Struktur erkennen (Durchmesser $6 \mu m$). Außerdem finden sich vereinzelt Akantozyten (re. unten und oben in der Mitte).

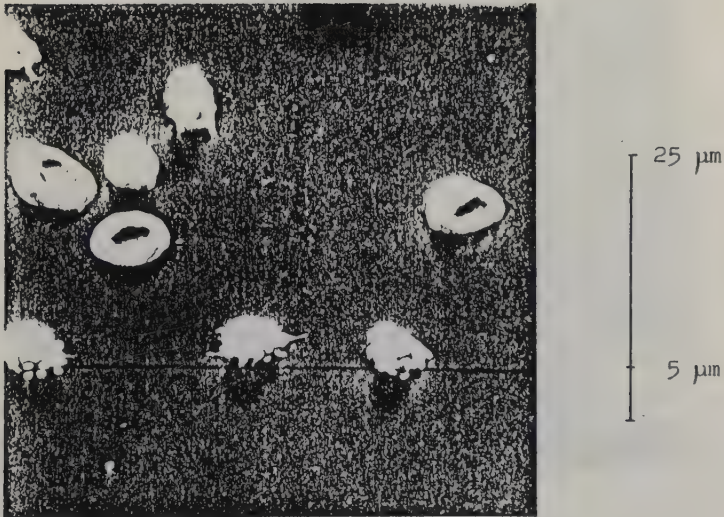


Abb.24: Erythrozyten nach 2stündiger Inkubation in
Ölsäure-haltigem Medium ($0,033 \text{ mmol/l}$), ohne
Lysis (!)

Ausschließlich Echinozyten I ergeben sich bei einer
Ölsäure-Konzentration von $3,3 \text{ µmol/l}$ im Außenmedium:
Abbildung 25. Die Zellen besitzen einen mittleren
Durchmesser von $6,5 \text{ µm}$. Das Bild entspricht annähernd
dem, das man beim Einschluß von $0,33 \text{ µmol/l}$ ($1/1000$
der Ausgangskonzentration) erhält (Abbildung 14).

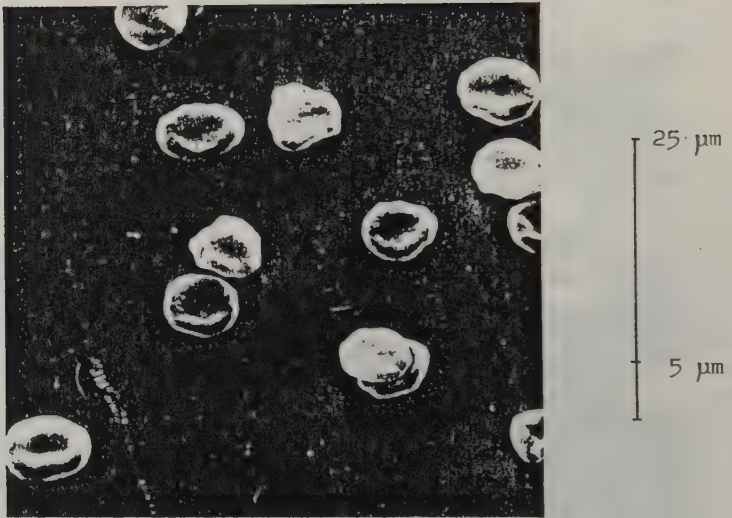


Abb.25: Echinozyten I; 3,3 $\mu\text{mol/l}$ Ölsäure im Außenmedium, ohne Lysis

Eine Verringerung der Ölsäure-Konzentration auf 0,33 $\mu\text{mol/l}$ im Außenmedium - i.e. 1/1000 der Ausgangskonzentration - (Abbildung 26) ergibt keine Abweichung gegenüber den Kontrollversuchen. Es finden sich ausschließlich normal geformte Discozyten mit einem Durchmesser von 7 μm .

Mit den im vorstehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnissen werden die Resultate früherer Autoren bestätigt

(9, 23); jedoch ergibt sich für diese Versuchsanordnung eine formverändernde Mindestkonzentration von $3,3 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure, im Gegensatz zu Deuticke, der

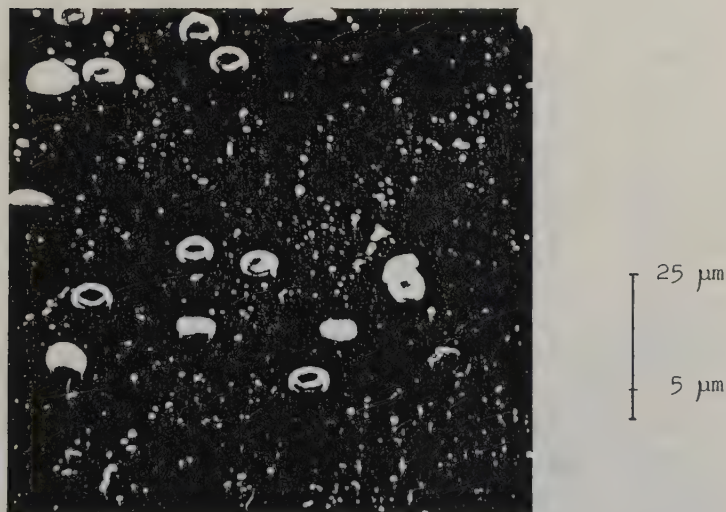


Abb.26: Erythrozyten nach 2stündiger Inkubation in $0,33 \mu\text{mol/l}$ Ölsäure, ohne Lysis

$50 \mu\text{mol/l}$ zur Auslösung morphologischer Alterationen von Erythrozyten ermittelt hatte. Bei der von Rumsby angegebenen Konzentration von 2 mmol/l erhält man mit dieser Versuchsanordnung eine vollständige Hämolyse.

Vergleicht man die mit Ölsäure beladenen Träger-Erythrozyten mit den nicht lysierten Erythrozyten, so

findet man, daß beide Zelltypen dieselbe Transformationssequenz vom Discozyten zum Echinozyten III durchlaufen, wobei auch bei den nicht lysierten Erythrozyten der Mikro-Sphärozyt als Endform nicht zur Darstellung gelangt; jedoch benötigt man zur Erzielung einer bestimmten Formveränderung beim Träger-Erythrozyten nur ca. 1/10 der Ölsäure-Konzentration, die zur gleichen Morphologie nicht lysierter Erythrozyten führt. Die bei den Einschluß-Präparaten wesentlich stärkere Hämolyse ist auf die Dialyse-Prozedur zurückzuführen.

3.3. Einfluß des pH-Wertes auf die Morphologie von Erythrozyten

Bereits in den Jahren 1967 und 1972 wiesen Deuticke et al. (9) sowie Bessis (2) auf die Bedeutung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration in Bezug auf die Morphologie humaner Erythrozyten hin. Weed und Chailley (37) vertieften in ihrer Arbeit die Untersuchungen der oben genannten Autoren und beschrieben bei erniedrigtem pH-Wert ($\text{pH} < 7$) eine Zunahme von Stomatozyten, bei erhöhten pH-Werten ($\text{pH} > 8$) eine Echinozytose.

Im folgenden wird - ausgehend von pH 6,5 bis zu einem pH-Wert von pH 8,4 - die Wasserstoff-Ionen-Konzentration um jeweils 0,1 pH-Einheiten erhöht und der Einfluß auf das Formverhalten der Erythrozyten dokumentiert. Hierbei wird nicht zu jeder Stufe der pH-Reihe eine

Abbildung gezeigt, da die Unterschiede sehr diskret ausfallen und nur in größeren Abständen (Δ pH 0,3 bis Δ pH 0,4) eine Veränderung der Morphologie zu erkennen ist.

pH 6,5: Abb.27: Stomatozyten (Bildmitte) in verschiedenen Projektionen

pH 6,6: Abb.28: Stomatozyt mit einem Durchmesser von 5 μ m

pH 6,8: Abb.29: Stomatozyt (unten); die unikonkave Einziehung fällt gegenüber den vorausgegangenen Bildern geringer aus

pH 6,8: Abb.30: "typical field": Discozyten, Stomatozyten mit geringer Einziehung

pH 7,1: Abb.31: Discozyten mit einem Durchmesser von 7 μ m; vereinzelt Echiozyten I

pH 7,2: Abb.32: Discozyt, Durchmesser 7 μ m (oben); eine Zuordnung der Zelle unten (Stomatozyt oder Discozyt) anhand dieser Abbildung ist nicht möglich

pH 7,4: Abb.33: Echinozyten I , deren Durchmesser im Mittel 6,5 μm beträgt

pH 7,8: Abb.34: Echinozyten I, im Vergleich zu pH 7,4
deutlichere Betonung der Spicules

pH 8,4: Abb.35: Echinozyten II und III; dieses Bild
gibt den Anteil der Echinozyten, der etwa bei
50% liegt, nicht genau wieder.

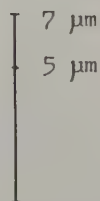
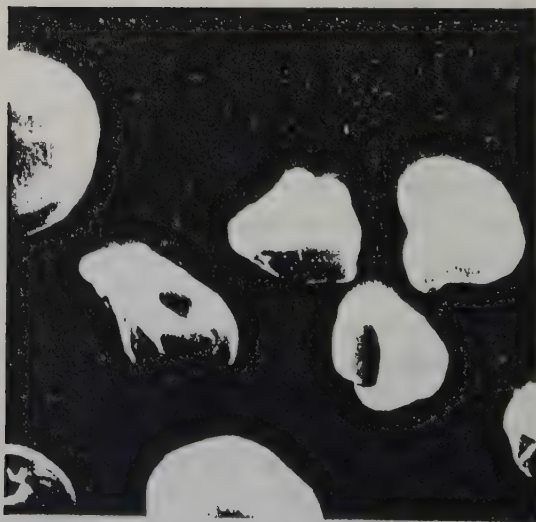


Abb.27
pH 6,5

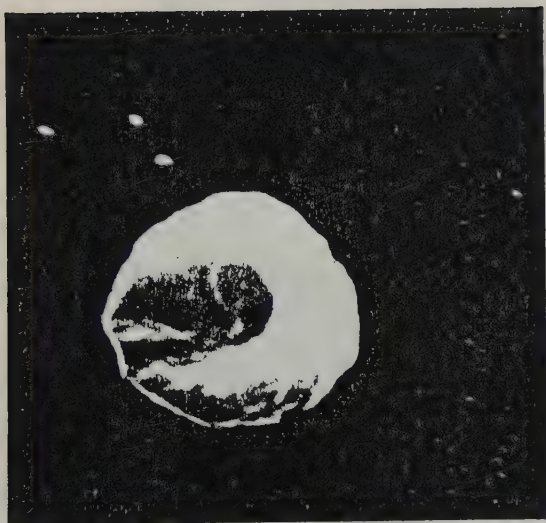


Abb. 28
pH 6,6

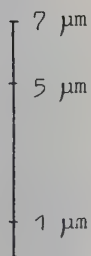
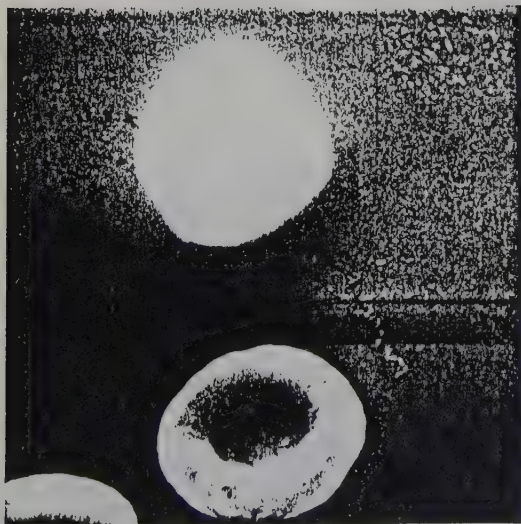


Abb. 29
pH 6,8

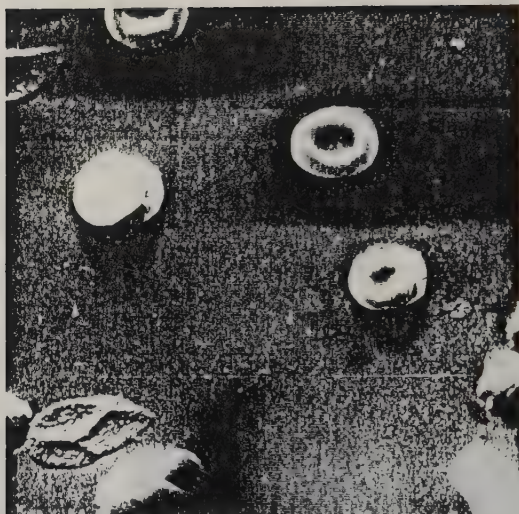


Abb. 30
pH 6,8

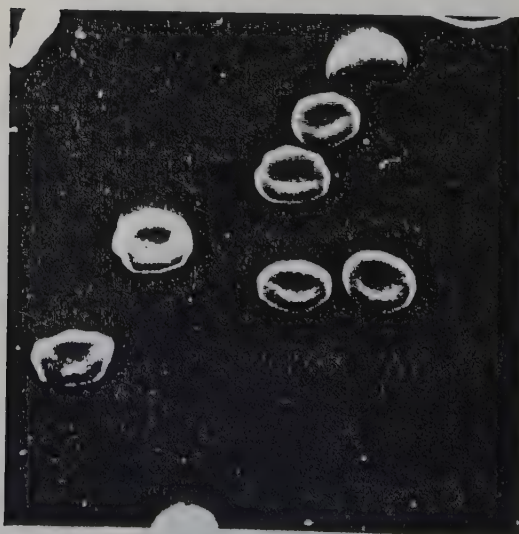


Abb. 31
pH 7,1

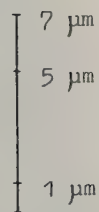
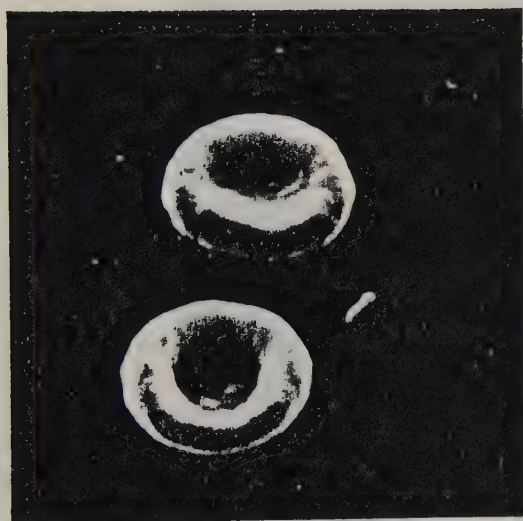


Abb. 32
pH 7,2

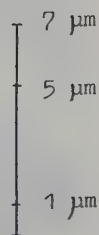


Abb. 33
pH 7,4



Abb. 34
pH 7,8



Abb. 35
pH 8,4

Die auf den vorangegangenen Seiten dargestellten morphologischen Alterationen sind die für den jeweiligen pH-Wert vorherrschenden, jedoch finden sich in jedem Präparat überwiegend Discozyten. Ebenso kommen Stomatozyten auch bei hohen pH-Werten und Echinozyten bei erniedrigtem pH-Wert vor. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, daß bei pH 7,2 (Abbildung 32) die geringsten Abweichungen von der bikonkaven Normalform der Erythrozyten beobachtet werden.

Zusammenfassend können die Ergebnisse früherer Autoren bestätigt werden; jedoch sind die morphologischen Alterationen roter Blutkörperchen, bedingt durch eine Änderung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, über einen Bereich von pH 6,8 bis pH 7,8 sehr gering.

3.4. Kontrollversuche

Die im folgenden beschriebenen Kontrollversuche sollen darlegen, inwiefern morphologische Veränderungen an Träger-Erythrozyten bzw. nicht lysierten roten Blutkörperchen bereits durch die verschiedenen Präparationsumstände (Lysis-Resealing, Temperatureinflüsse, verlängerte Präparationszeiten) bedingt werden, ohne daß eine membranaffine Substanz auf die Zellen eingewirkt hat.

3.4.1. Träger-Erythrozyten ohne Einschluß

3.4.1.1. Präparation unter Verwendung von Puffer I^+
Abbildung 36 zeigt Zellen, die nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methode der reversiblen hypotonen Dialyse

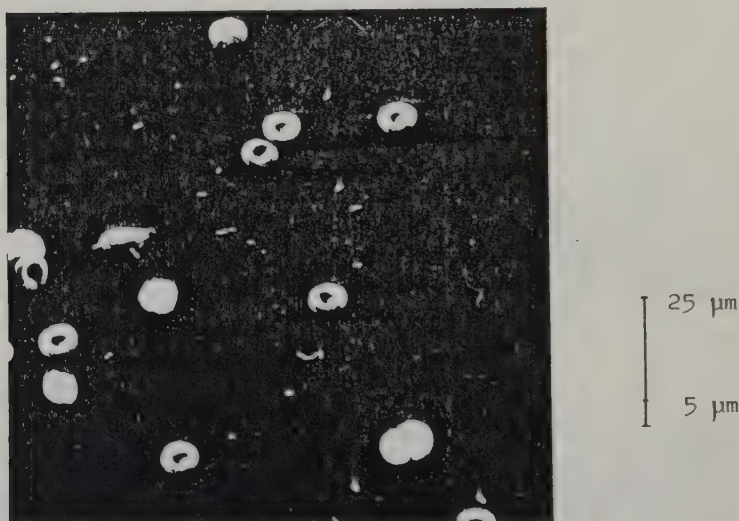


Abb.36: Träger-Erythrozyten ohne Einschluß: Discocyten
(Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde; Puffer I^+)

präpariert wurden, wobei zum Resealing der energie-
reiche Puffer I^+ verwendet wurde: es handelt sich über-
wiegend um Discocyten (ca. 70%) mit einem regelrechten
Durchmesser von $7\text{ }\mu\text{m}$; die Einkonkavität erscheint etwas

stärker betont als bei den nicht lysierten Zellen (z.B. Abbildungen 26 und 40), jedoch ist sie nicht so stark ausgeprägt wie bei den Zellen, für die zum Resealing der energiearme Puffer I verwendet wurde (Abbildung 37).

Die Abbildung 36 läßt noch ein anderes Phänomen erkennen, das bei allen REM-Präparationen von Träger-Erythrozyten wiederholt beobachtet werden kann: die Agglutination von Zellen. Hiervon insbesondere betroffen sind - wie in der Abbildung rechts unten oder links am Bildrand - Sphärozyten (siehe auch 3.5. Artefakte).

3.4.1.2. Präparation unter Verwendung von Puffer I

In diesem Falle wurde dem isotonen Puffer während des Resealing kein ATP zugesetzt (Abbildung 37). Im Vergleich zu dem vorangegangenen Präparat ist die Anzahl bikonkav geformter Zellen geringer. Die Träger-Erythrozyten lassen in ca. 50% der Fälle noch eine Bikonkavität erkennen, diese ist jedoch deutlicher betont als bei Verwendung von Puffer I⁺. Der Randwall dieser im Durchmesser etwas vergrößerten Träger-Erythrozyten weist noch keine Aussackungen im Sinne einer beginnenden Echinozytose (Abbildung 40) auf. Entsprechend der Nomenklatur von Eessis (2) sind diese Zellen als Codozyten zu bezeichnen. Bei den verbleibenden Zellen handelt es sich um Sphärozyten mit einer oder mehreren Einziehungen.

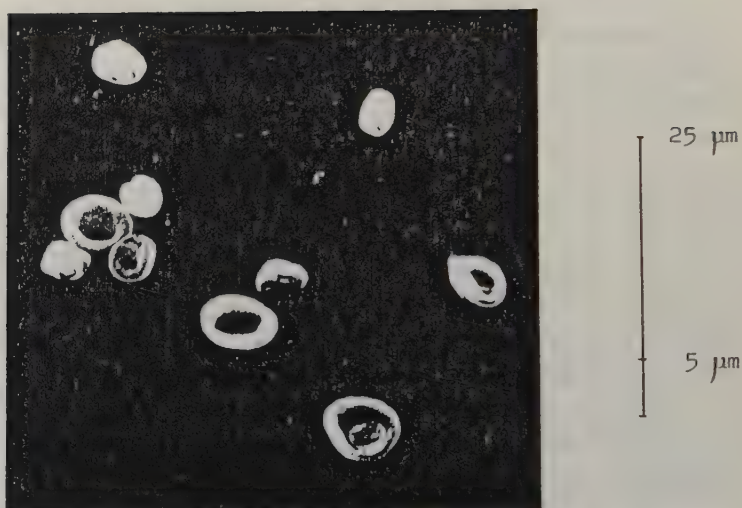


Abb.37: Träger-Erythrozyten ohne Einschluß: Codozyten (50%) und Sphärozyten (Präp.: 0° / 37° für je 1 Stunde; Puffer I)

3.4.2. Typ-II-Träger-Erythrozyten ohne Einschluß

Auch in diesem Versuch wurde den Erythrozyten während der Lysis keine einzuschließende Substanz angeboten, das Resealing fand für 12 Stunden in Puffer I⁺ bei 37° C statt (Abbildung 38). Es resultieren Echinozyten I und II, mit einem mittleren Durchmesser von 5 μm, im Gegensatz zu den ca. 7 μm messenden Echinozyten III

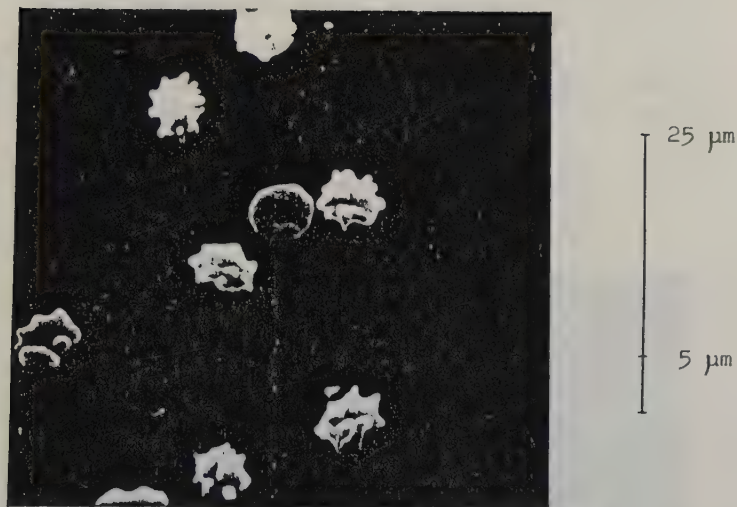


Abb.38: Typ-II-Träger-Erythrozyten ohne Einschluß
(Präp.: 0° / 37° für 1 bzw. 12 Stunden)

beim Ölsäure-Einschluß (Abbildung 23) und den beim Ca^{2+} -Einschluß entstehenden glattberandeten Sphärozyten (Abbildung 8), die einen Durchmesser von 5 µm besitzen.

3.4.3. Typ-I-Träger-Erythrozyten ohne Einschluß

Wie in allen Versuchen, in denen die Temperatur während des Resealing 0° C betrug, resultiert auch hier eine starke Hämolyse, während die Ausbeute an wiederver-schlossenen Zellen relativ gering bleibt. Für Typ-I-

Träger-Erythrozyten ohne Einschluß ergibt sich der Echino-Sphärozyt als vorherrschende Zellform (ca. 80%), vereinzelt finden sich Echinozyten II und Sphärozyten (ohne Abbildung)(vgl. a. Abbildung 5 und 22).

3.4.4. Nicht lysierte Erythrozyten nach 12stündiger Inkubation in isotonischer Lösung

3.4.4.1. Inkubation ohne ATP-Zusatz



Abb.39: nicht lysierte rote Blutkörperchen nach 12stündiger Inkubation in isotonischem Puffer I

Abbildung 39 zeigt alle Stadien der Echinozytose: Echinozyten I (rechts oben) und Echinozyten II, im wesentlichen jedoch die bereits von anderen Autoren (2, 9, 11, 19, 22, 37) unter denselben Bedingungen beschriebenen Echinozyten III, deren Durchmesser 6 μm beträgt. Auffallend ist die - im Vergleich zu den beim Ölsäure-Einschluß entstehenden Echinozyten III (Abbildung 19) - geringere Anzahl der Spicules.

3.4.4.2. Inkubation in angereichertem Puffer I⁺

Im Gegensatz zum vorhergehenden Präparat findet sich in

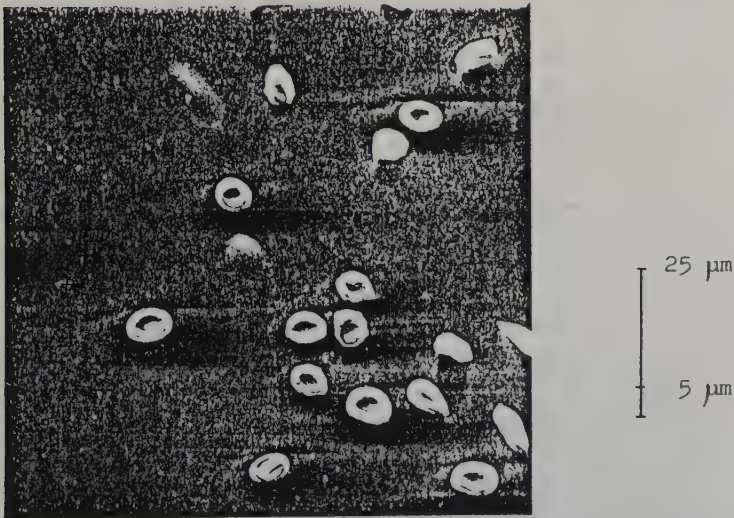


Abb.40: nicht lysierte Erythrozyten nach 12stündiger Inkubation in angereichertem Puffer I⁺

diesem Präparat nur das erste Stadium der Echinozytose in Verbindung mit normal geformten Discozyten, deren Bikonkavität regelrecht ausgebildet ist (Abbildung 40).

Aus den vorhergehenden drei Abbildungen ergibt sich zusammenfassend, daß eine Träger-Erythrozyten-Präparation mit 12stündigem Resealing deutlich stärkere Alterationen der äußeren Form hervorruft (Echinozyten II), als sie bei Zellen, die über denselben Zeitabstand inkubiert, aber nicht lysiert, wurden, zu beobachten ist (Echinozyten I).

Ein Vergleich zwischen nicht lysierten Erythrozyten, denen während der 12stündigen Inkubation kein ATP zugeführt wurde und den ebenfalls ohne ATP-Zusatz und ohne Einschluß gewonnenen Träger-Erythrozyten (s. Abbildung 7) ergibt keinen qualitativen Unterschied: es handelt sich fast ausschließlich um Echinozyten III.

3.5. Darstellung einiger typischer Artefakte

Die Träger-Erythrozyten-Präparation wie auch die Weiterbehandlung der Blutzellen für die Raster-Elektronen-Mikroskopie (3, 28) sind für einige Phänomene verantwortlich zu machen, die im REM-Bild als Artefakte imponieren. Durch diese "Artefakte" kann die morphologische Beurteilung der (Träger-)Erythrozyten stark beeinträchtigt werden. Die auf den folgenden Seiten gezeigten Abbildungen 41 bis 47 sollen die in dieser Arbeit

beobachteten Artefakte darstellen.

Abbildung 41 zeigt ein typisches Bild, das bei Träger-Erythrozyten-Präparationen häufiger gefunden wird, während es bei nicht lysierten Erythrozyten praktisch nicht auftritt: die Agglutination von Zellen. Sie ist in diesem Ausschnitt besonders stark ausgeprägt, läßt sich jedoch in geringem Ausmaß in fast allen REM-Präparaten von Träger-Erythrozyten mit und ohne Einschluß beobachten. Dieses Phänomen tritt auf, sobald die auf dem Deckglas ausgestrichenen Zellen in die Petrischalen mit der 3%igen Glutaraldehydlösung gegeben werden und ist dann - wie in diesem Fall - bereits makroskopisch als "Ausfällung" sichtbar.

Die Abbildungen 42 bis 44 lassen ein Artefakt erkennen, das sowohl bei nicht lysierten roten Blutzellen, als auch bei Träger-Erythrozyten zur Darstellung kommt: die Zellen scheinen in einem "Krater" zu liegen, wobei sich diese Vertiefung oftmals - wie in Abbildung 43 - auf einer über dem Niveau des Präparates erhabenen Stelle befindet.

Ebenfalls fast ausschließlich auf erhabenen Stellen kommt es zu dem in Abbildung 45 gezeigten Artefakt: die Zelle - Träger-Erythrozyten ebenso wie nicht lysierte Zellen - erscheint mit dem Untergrund "verbacken" und in ihrer äußeren Form nicht vollständig verfolgbar. In besonders ausgeprägten Fällen kommt es zu einer vollständigen Verschmelzung der Zellen mit dem Untergrund: Abbildung 46.

Seite 63:

- Abb.41: agglutinierte Träger-Erythrozyten
- Abb.42: Echinozyt III, in einer Vertiefung liegend

Seite 64:

- Abb.43: Echinozyt III, der "Krater" liegt auf einer Erhöhung
- Abb.44: Stomatozyt in einem "Krater" liegend

Seite 65:

- Abb.45: Echinozyt II, der mit dem Untergrund "verbacken" ist
- Abb.46: Extremform der in den Abbildungen 43 und 45 dargestellten Artefakte

Seite 66:

- Abb.47: Oberflächenrisse an einem Discozyten (nach halbjähriger Lagerung des Präparates)



Abb. 41

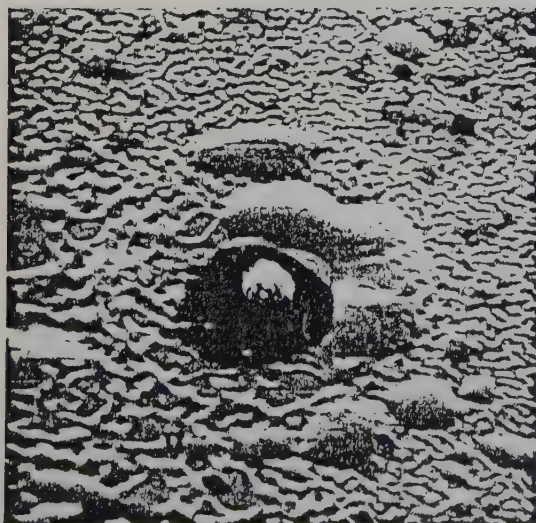


Abb. 42

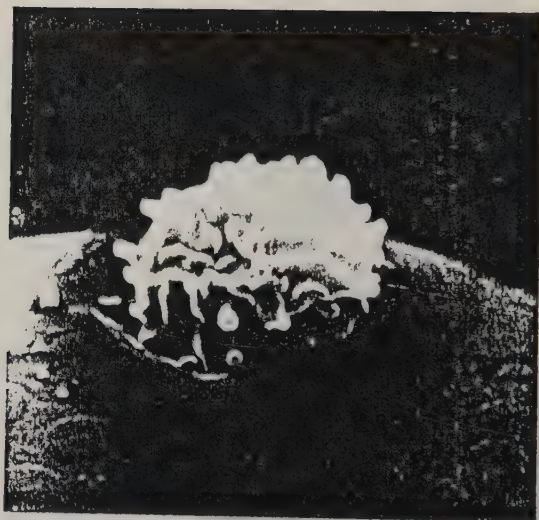


Abb. 43

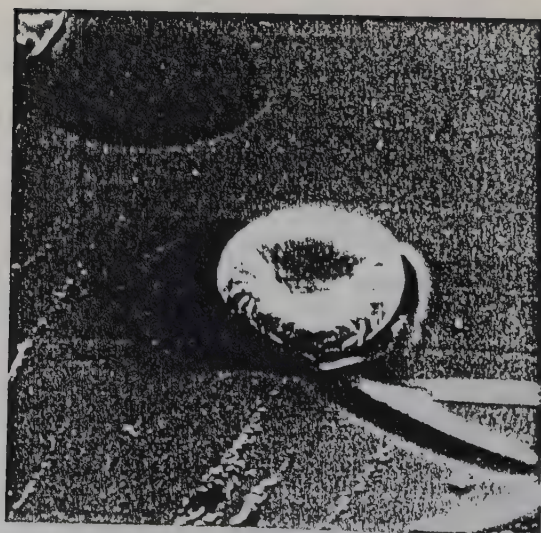


Abb. 44

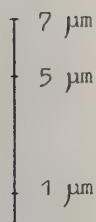


Abb. 45

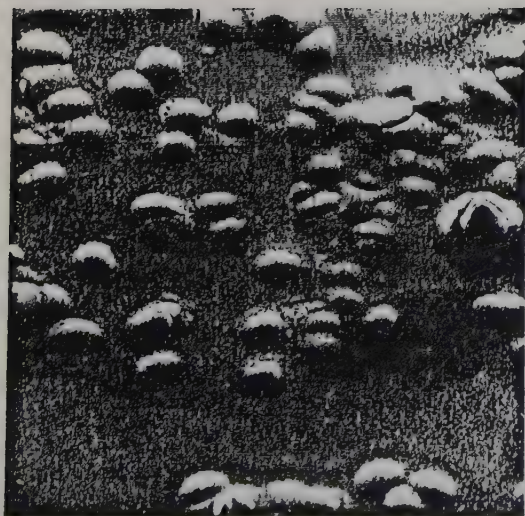


Abb. 46

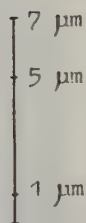
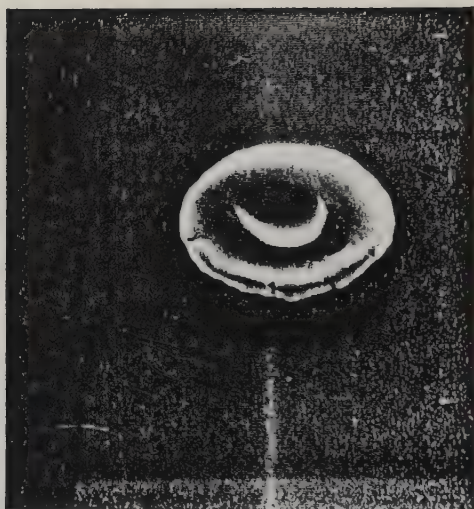


Abb. 47

Nach einer halbjährigen Lagerung der fixierten und goldbedampften Präparate in einem Unterdruckgefäß kann es zu den in Abbildung 47 dargestellten Veränderungen der Zellen kommen: die Oberfläche zeigt diskrete, ca. 1 µm tiefe Einrisse. Diese Veränderungen finden sich allerdings nur sehr vereinzelt und in einigen Präparaten, wobei kein Unterschied zwischen unbehandelten Erythrozyten und Träger-Erythrozyten besteht.

4. DISKUSSION

Die vielfältigen morphologischen Erscheinungen humaner Erythrozyten in vivo und in vitro, sowie die Hämolyse, bedingt durch den Verlust der normalen bikonkaven, im Querschnitt hantelartigen Form, stehen bereits seit Beginn dieses Jahrhunderts im Mittelpunkt umfangreicher Forschungen. Die Einführung der Elektronen-Mikroskopie, insbesondere der Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM), eröffnete, durch die Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellung, der Erforschung biologischer Materie neue Wege (15, 25). So gelang es im Laufe der letzten Dekade durch zahlreiche Untersuchungen ein detailliertes Bild des Formverhaltens roter Blutkörperchen zu erstellen.

Man konnte viele Substanzen finden, die in unterschiedlichem Ausmaß die Form der Erythrozyten beeinflussen, wobei bereits Ponder (21) und später Deuticke et al. (9), sowie Weed und Chailley (37) diese Substanzen in zwei Klassen einteilten: diese Autoren beschreiben zum einen Substanzen, die eine Echinozytose auslösen, während andere eine Stomatozytose bewirken. Bei hohen Konzentrationen dieser Wirkstoffe resultiert in beiden Fällen als gemeinsame Endform der Mikro-Sphärozyt, der nach Deuticke eine prälytische Zellform ist. Die beider "Transformationssequenzen" sind in der nachstehenden Abbildung dargestellt:

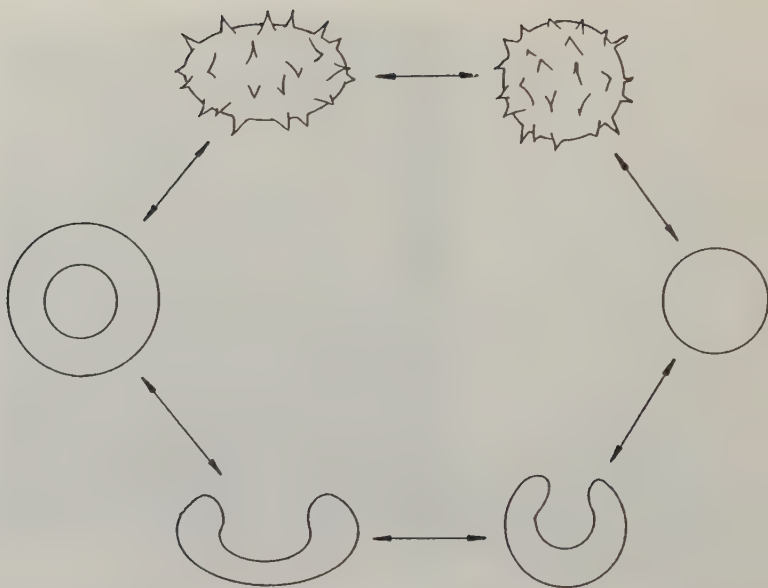


Abb.48: Transformationssequenzen vom Discozyten zum Mikro-Sphärozyten

Inwieweit sich die in der vorstehenden Abbildung gezeigten Übergangsmöglichkeiten des Discozyten zum Mikro-Sphärozyten gegenseitig ausschließen, bzw. ob es sich bei den echinozytogenen und stomatozytogenen Substanzen um antagonistisierende Wirkstoffe handelt (9), ist noch ungeklärt. Ebenso wird auf Grund elektronenoptischer Untersuchungen einiger Autoren (s. Grimes (13)) die gemeinsame prälytische Endform in Frage gestellt; die jeweils resultierenden - lichtmikroskopisch als

Mikro-Sphärozyten bezeichneten - Zellen sollen in ihrer Oberflächenstruktur stets bestimmte Residuen - i.e. Spicules als Restzustand des Echinozyten bzw. eine oder mehrere Einziehungen als Restzustand des Stomatozyten - aufweisen, die dann eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Transformationssequenzen zulassen. Diese als Echino-Sphärozyten und Stomato-Sphärozyten bezeichneten Zellen (2) lysieren dann, ohne ein gemeinsames Endstadium durchlaufen zu haben.

Auf Grund der andersartigen Problemstellung und wegen der begrenzten rasterelektronenmikroskopischen Möglichkeiten (Vergrößerungen nur bis maximal 10000x) wurden diese Fragen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht behandelt; es sei jedoch darauf hingewiesen, daß auch Intermediärformen (sog. Stomato-Echinozyten), wie Weed und Bessis (38) sie in diesem Zusammenhang beschreiben, nicht gefunden wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Morphologie von Träger-Erythrozyten zu dokumentieren, und das Formverhalten als Parameter für den Einfluß membranwirksamer Substanzen auf Membranaufbau und Zytoskelett der Zelle zu untersuchen.

Die Experimente stellen Modellversuche dar, inwieweit es, insbesondere auch durch einen intrazellulären Angriff dieser Substanzen, zu derartigen Veränderungen kommt, da es mittels der reversiblen hypotonen Dialyse erstmals ermöglicht wird, membranaktive Substanzen in den Erythrozyten einzuschleusen, ohne daß dieser durch

das Präparationsverfahren an sich in Form und Zellinhalt wesentlich alteriert wird.

In den Versuchen wurde auch das Formverhalten von Träger-Erythrozyten dem normaler roter Blutkörperchen, sowie dem von Erythrozyten-Ghosts vergleichend gegenübergestellt.

Es wurden zwei Substanzen in Träger-Erythrozyten eingeschlossen, deren Einfluß auf das Formverhalten roter Blutzellen im Sinne der Auslösung einer Echinozytose bekannt ist: Calcium-Ionen und frei Ölsäure. Während der Wirkungsmechanismus der Calcium-Ionen offensichtlich an eine intraerythrozytäre Lokalisation gebunden ist (s. den physiologischen Plasma-Spiegel des ionisierten, d.h. freien Ca^{2+} von ca. 1,2 mmol/l, der ohne Einfluß auf die Form der Erythrozyten bleibt), bewirkt eine 15minütige Inkubation nicht lysierter Blutkörperchen in freier Ölsäure bereits eine Echinozytose (23).

Wie bereits oben erwähnt, besitzen die Experimente - insbesondere in Bezug auf den Wirkungsmechanismus von Ölsäure - Modellcharakter: Erstmals wurde der Einfluß einer intraerythrozytären, langkettigen, einfach ungesättigten Fettsäure auf die Morphologie untersucht; auf eine genaue Bestimmung der intrazellulären Ölsäurekonzentration wurde auf Grund des Modellcharakters der Versuche verzichtet.

Die Literaturangaben über die intraerythrozytäre Ca^{2+} -Konzentration unterliegen starken, methode-abhängigen

Schwankungen: 0,05 mmol/l - 0,2 mmol/l (12). Dunn (11) ging in seinen Untersuchungen von 0,015 mmol/l aus; in der vorliegenden Arbeit wurde die von Palek (20) ermittelte Ca^{2+} -Innen-Konzentration von 0,016 mmol/l als physiologische Ca_i^{2+} -Konzentration angesehen. Diese Angaben beziehen sich auf das Gesamt-Calcium, schließen also das im Erythrozyten an Eiweiße gebundene Calcium ein, sodaß eine Konzentration von 0,016 mmol/l freiem, d.h. ionisiertem Calcium wahrscheinlich zu hoch angesetzt ist (13).

Auf Grund dieser methode-abhängigen Differenzen in der Calciumbestimmung sowie des Modellcharakters der Versuche wurde, ebenso wie bei den Ölsäure-Experimenten, auf eine exakte quantitative Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verzichtet.

Es wird vereinfachend angenommen, daß es während der reversiblen hypotonen Dialyse zur Einstellung eines Diffusionsgleichgewichtes zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Substratkonzentration kommt, sodaß semiquantitativ davon ausgegangen werden kann, daß es bei einer Vervielfachung der angebotenen Substanzkonzentration während des Dialyse-Vorganges zu einem proportionalen Konzentrationsanstieg der eingeschlossenen Substanz kommt.

Beim Einschluß verschiedener Calcium-Konzentrationen in Träger-Erythrozyten (s. 3.1.1.) ergeben sich für 0,016 mmol/l Ca^{2+} im wesentlichen regelrecht geformte Discozyten, zum Teil auch Codozyten auf Grund eines

geringen Hämoglobin-Verlustes während der Dialyse-Prozedur; es bestehen insgesamt keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollversuchen (s. 3.4.). Bei Erhöhung der Einschluß-Konzentration auf das 3-, 12- und 25fache der physiologischen Innen-Konzentration durchlaufen die Träger-Erythrozyten eine Stomatozytose, die bereits bei 0,05 mmol/l voll ausgeprägt ist und bei 0,2 mmol/l die Endform, den Mikro-Sphärozyten, erkennen läßt.

Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht bemerkenswert: zum einen liegt die zur Auslösung einer Formveränderung der Zellen benötigte Calcium-Innen-Konzentration weit unter der von Dunn (11) angegebenen Konzentration von 0,8 mmol/l; zum anderen durchlaufen die Träger-Erythrozyten eine Stomatozytose, wohingegen nicht lysierte Erythrozyten, deren Ca_i^{2+} -Konzentration anderweitig erhöht wurde (Trinitrocresol, Ionophore A23187), über Echinozyten in Mikro-Sphärozyten übergehen (11, 39). Dieses Formverhalten der Träger-Erythrozyten weicht auch von dem Erythrozyten-Ghosts ab, für die Palek (19) bei Erhöhung der Ca_i^{2+} -Konzentration eine ausgeprägte Zellpolymorphie mit Vorherrschen von Echinozyten beschreibt.

Einigen Autoren zufolge (s. Grimes (13)) ist die Ausbildung von Spicules bei hoher intraerythrozytärer Calcium-Konzentration auf eine "Überlastung" der Calcium-Pumpen zurückzuführen; aus der Anzahl und Lokalisation der Spicules kann auf die Zahl und Lokalisation der Ca^{2+} -Pumpen geschlossen werden. Inwieweit sich diese Überlegungen mit dem Formverhalten von Träger-Erythro-

zyten bei erhöhter Ca_i^{2+} -Konzentration in Einklang bringen lassen, muß noch offen bleiben.

Einen gewissen Widerspruch erfahren die obengenannten Überlegungen jedoch durch die Ergebnisse beim Ölsäure-Einschluß in Träger-Erythrozyten, bzw. bei der Beurteilung der Morphologie normaler, nicht lysierter roter Blutkörperchen nach zweistündiger Inkubation in Ölsäure-haltigem Medium: Zahl und Form der entstehenden Spicules weichen deutlich von denen der Spicules ab, die durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration entstehen (s. a. Kontrollversuch 3.4.4.1.: 12stündige Inkubation in energiearmem Medium $\rightarrow$ Absinken des intrazellulären ATP-Spiegels $\rightarrow$ Versagen der Ca^{2+} -Pumpe $\rightarrow$ Erhöhung des intraerythrozytären Calcium $\rightarrow$ Ausbildung von Spicules). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Rumsby (23) und bestärken das bereits von Sheetz und Singer (28) erstellte Postulat, dem zufolge eine Echinozytose über verschiedene, von der jeweiligen auslösenden Substanz abhängige, Mechanismen bewirkt werden kann. Ebenso wie Allen et al. (1) für Diacylglycerol vermutet Rumsby als Wirkungsmechanismus der Ölsäure einen teilweisen Einbau derselben in die Erythrozyten-Membran, was eine Zerstörung des normalen doppelschichtigen Membranaufbaues zur Folge hat.

Letztere Überlegungen Rumsbys werden durch den Einschluß von Ölsäure in Träger-Erythrozyten teilweise bestätigt. Intraerythrozytäre Ölsäure bewirkt bei gleicher Konzentration eine wesentlich stärkere Echinozytose als von außen auf die Erythrozyten einwirkende

Ölsäure. Offensichtlich besteht eine vermehrte Anfälligkeit der Innenseite der Erythrozyten-Membran für diese echinozytogene Substanz, sodaß zur Auslösung eines bestimmten Grades der morphologischen Alteration für Träger-Erythrozyten nur ca. $1/10$ der Ölsäure-Konzentration benötigt wird, die für nicht lysierte Erythrozyten, die lediglich in Ölsäure-haltigem Medium inkubiert wurden, notwendig ist. Eine erhöhte Vulnerabilität der Membran-Innenseite, die Sitz zahlreicher membrangebundener Enzyme ist, beschrieben Rillah et al. (4) bereits für Änderungen der Ionenzusammensetzung der Membran.

Ein weiterer interessanter Aspekt beim Ölsäure-Einschluß in Träger-Erythrozyten ergibt sich aus der Tatsache, daß es - ebenso wie bei den Ölsäure-Inkubations-Versuchen - mit der vorgegebenen Versuchsanordnung nicht möglich ist, eine prälytische Endform darzustellen. So finden sich in allen Präparaten mit hoher Einschluß-Konzentration Echinozyten III und nur sehr vereinzelt Echino-Sphärozyten; andererseits können - nach Konzentrationserhöhung der einzuschließenden Ölsäure - auf Grund einer vollständigen Hämolyse keine Träger-Erythrozyten für die REM-Präparation gewonnen werden. Offensichtlich ist das beim Ölsäure-Einschluß entstehende Endstadium der Transformationssequenz, der (Echino-)Mikro-Sphärozyt, sehr kurzlebig, sodaß er - im Gegensatz zum Calcium-Einschluß - nicht zur Darstellung gelangt. Beim Calcium-Einschluß bewirkte eine Verdoppelung der Konzentration von $0,2 \text{ mmol/l}$ auf $0,4 \text{ mmol/l}$ keine Formveränderung der Zellen mehr, zu einer Hämolyse kam es jedoch auch nicht.

Ein morphologisch uneinheitliches Bild ergab sich bei dem Versuch, die von Bodemann und Passow (5) beschriebene Typisierung der Erythrozyten-Ghosts auf Träger-Erythrozyten zu übertragen. Während für die 'Ghosts' - auf Grund ihres Permeabilitätsverhaltens für Ionen und Makromoleküle - eine relativ eindeutige morphologische Zuordnung gelingt, ist für Träger-Erythrozyten eine derartige Klassifizierung auf Grund der Morphologie nur sehr bedingt möglich.

Für Typ-I-Ghosts, die sich bereits in hypoosmolarem Millieu wieder verschließen, ergibt sich der Echinozyt, da diese Zellen für Kationen impermeabel sind und infolge dessen im isotonischen Medium schrumpfen; bei Typ-I-Träger-Erythrozyten handelt es sich im wesentlichen um Echino-Sphärozyten. Der Typ-II-Ghost, der trotz Wiederherstellung der Isotonizität auf längere Zeit für Kationen und Makromoleküle permeabel bleibt, nimmt durch Wasseraufnahme stark an Volumen zu: es resultiert ein Sphärozyt; Typ-II-Träger-Erythrozyten, die für 12 Stunden in Puffer I^+ verschlossen wurden, zeigen die ersten beiden Stadien der Echinozytose, wobei diese Echinozytose nicht auf ein Absinken des intraerythrozytären ATP-Spiegels zurückzuführen ist, wie die Kontrollversuche unter 3.4.4. zeigen. Für Typ-III-Ghosts und Typ-III-Träger-Erythrozyten ergibt sich in beiden Fällen der normal geformte Discozyt.

Schließt man in diese Träger-Erythrozyten Calcium-Ionen ($0,05 \text{ mmol/l}$) bzw. Ölsäure ($33 \text{ } \mu\text{mol/l}$) in mittlerer, eine Formveränderung bewirkender Konzentration ein, so

resultiert folgendes Bild: bei den Typ-I-Träger-Erythrozyten werden aus den Echino-Sphärozyten zum einen multikonkave Zellen (Calcium), zum anderen glattberandete Sphärozyten (Ölsäure). Für Typ-II-Träger-Erythrozyten, die sich ohne Einschluß als Echinozyten I bzw. II darstellen, ergeben sich Sphärozyten (Calcium) bzw. Echinozyten III mit relativ wenigen Spicules (Ölsäure). Für die unter Standardpräparationsbedingungen hergestellten Typ-III-Träger-Erythrozyten ergeben sich Stomatozyten (Calcium) und Echinozyten III (Ölsäure).

Weed und Bessis (38) beobachteten für pathologische Zellformen eine Überlagerung derselben durch echinozytogene und stomatozytogene Substanzen, im Sinne einer Echinozytose bzw. Stomatozytose. So gelang es ihnen z.B. Akantozyten durch Chlorpromazin (einem stomatozytogenen Wirkstoff) in Stomatozyten überzuführen. Diese Überlagerung der zugrundeliegenden Zellform gelingt bei Typ-I- und Typ-II-Träger-Erythrozyten nicht vollständig. Zwar verlieren diese durch den Einschluß von Calcium bzw. Ölsäure ihre ursprüngliche Form, jedoch gelingt es z.B. nicht, die Echinozyten I und II (Typ-II-Träger-Erythrozyten) durch den Einschluß von $0,05 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ in Stomatozyten überzuführen.

Da die untersuchten Erythrozyten ausschließlich aus heparinisiertem, nicht gelagertem Frischblut stammten, können Artefakte im Sinne einer durch längere Lagerung ausgelösten Echinozytose, wie sie von anderen Autoren beobachtet wurden (3, 22), weitgehend ausgeschlossen werden.

Durch die - von verschiedenen Autoren als besonders schonend beschriebene - Fixierung mittels Glutaraldehyd (6) und anschließende Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3, 10, 36) konnten Fixierungsartefakte, besonders das vermehrte Auftreten von Stomatozyten, vermieden werden (zu den letzten beiden Abschnitten siehe auch die Kontrollversuche unter 3.4.).

Offenbleiben muß in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit die bei Träger-Erythrozyten verstärkt auftretenden Agglutinationen (s. z.B. Abbildung 41) erklärt werden können. Als Antwort könnte die Tatsache in Betracht kommen, daß Erythrozyten nach einer künstlich induzierten Hämolyse eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit, ähnlich der der kongenitalen Sphärozytose, besitzen, was dann Anlaß zu den gehäuften Agglutinationen sein könnte (25). Auf eine durch die Hämolyse veränderte dreidimensionale Membranstruktur wies (allerdings bei Erythrozyten-Ghosts) bereits Staros (35) hin.

Zusammenfassend wird noch einmal darauf hingewiesen, daß es sich bei den Experimenten um Modellversuche handelt: Es konnte qualitativ gezeigt werden, daß die Konzentrationserhöhung zweier Substanzen - Calcium-Ionen und Ölsäure - zu definierten Formveränderungen roter Blutzellen führt, wobei diese Formveränderungen bei intrazellulärem Angriff wesentlich stärker ausfallen bzw. für Calcium-Ionen an eine intraerythrozytäre Lage gebunden sind.

Infolgedessen wird die Morphologie insofern als Parameter für die Membranbeschaffenheit der Zelle, sowie die Membranaffinität dieser Substanzen interpretiert, als vom Ausmaß der Änderungen auf die Art der einwirkenden Substanz bzw. ihren Wirkort rückgeschlossen werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- (1) Der Einfluß der Membranaffinität bestimmter physiologisch und pharmakologisch wirksamer Substanzen auf Zytoskelett und Membranaufbau ist weitgehend unbekannt oder entzieht sich einer raschen und einfachen Untersuchung. Es wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Morphologie von Erythrozyten als Modell für die Membranwirksamkeit zweier Substanzen - Calcium-Ionen und Ölsäure - zu erhalten. Um die Wirkung auf die Membraninnenseiten zu ermitteln, wurden diese Substanzen in die Erythrozyten eingeschlossen, wobei hierfür die reversible hypotone Dialyse nach Sprandel verwendet wurde, da sie sich für den Einschluß solcher Substanzen als besonders geeignet erwiesen hat.
- (2) Ausgehend von 0,016 mmol/l, der physiologischen Ca_i^{2+} -Konzentration in Erythrozyten, resultieren bei einem Anstieg des in Träger-Erythrozyten eingeschlossenen Calcium auf 0,05 mmol/l Stomatozyten, die bei 0,2 mmol/l in Sphärozyten übergehen. Träger-Erythrozyten verhalten sich somit anders als nicht lysierte rote Blutzellen, die beim Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration die zur Stomatozytose komplementäre Transformationssequenz, die Echinozytose, durchlaufen. Auch zu Erythrozyten-Ghosts, denen während der hypoosmolaren Phase Calcium-Ionen zugesetzt wurden, besteht ein Unter-

schied, da letztere unter diesen Bedingungen ebenfalls Spicules ausbilden.

- (3) Schließt man freie Ölsäure in einer Konzentration von 0,33 mmol/l in Träger-Erythrozyten ein, so resultieren fast ausschließlich Echinozyten III. Bei Erniedrigung der Konzentration auf 1/10 und 1/100 der Ausgangskonzentration nehmen die Echinozyten III zahlenmäßig zugunsten von Echinozyten II und I ab; bei 0,33 μ mol/l eingeschlossener Ölsäure werden nur noch Echinozyten I beobachtet.

Eine Verdopplung der Ölsäure-Ausgangskonzentration bewirkt eine komplette Hämolyse der Träger-Erythrozyten. Im Gegensatz hierzu bewirkt bei den durch Calcium-Ionen induzierten Sphärozyten eine Verdopplung der Calcium-Konzentration auf 0,4 mmol/l weder eine weitere morphologische Veränderung, noch eine Hämolyse der Träger-Erythrozyten.

- (4) Nach zweistündiger Inkubation nicht lysierter Erythrozyten in Ölsäure-haltigem Medium finden sich ebenfalls konzentrationsabhängig alle Stadien der Echinozytose; auch hier gelangt der Mikro-Sphärozyt, die prälytische Endform im Sinne Deutickes, nicht zur Darstellung.
- (5) Mit dieser Versuchsanordnung wird die von Deuticke zur Auslösung der Echinozytose genannte Mindestkonzentration von 50 μ mol/l Ölsäure auf 3,3 μ mol/l gesenkt.

- (7) Zur Ausbildung desselben Grades morphologischer Alteration wird bei der Inkubation eine ca. 10fach höhere Ölsäure-Konzentration als bei Träger-Erythrozyten benötigt. Dies läßt auf eine erhöhte Vulnerabilität der Erythrozyten-Innen-Membran schließen.
- (8) Um die von Bodemann und Passow erstellte Einteilung von Erythrozyten-Ghosts auf Träger-Erythrozyten übertragen zu können, wird die Standard-Präparation, wie unter 3.1.2. beschrieben, abgeändert. Im REM-Bild imponiert der Typ I als Echino-Sphärozyt, die Typ-II-Zellen als Echinozyten II und I. Typ-III-Träger-Erythrozyten sind die bei Standard-Präparation gewonnenen Discozyten.

Beim Einschluß von Calcium-Ionen und Ölsäure in mittlerer, eine morphologische Alteration bewirkender Konzentration, kommt es bei Typ-I- und Typ-II-Träger-Erythrozyten nicht zur Ausbildung von Stomatozyten (Calcium) bzw. Echinozyten (Ölsäure), vielmehr resultiert ein uneinheitliches Bild. Es kommt zu keiner Überlagerung der ursprünglichen Zellform durch stomato- oder echinozytogene Substanzen.

- (9) Bezüglich des morphologischen Verhaltens von Erythrozyten bei unterschiedlichen Wasserstoff-Ionen-Konzentrationen können andere Autoren bestätigt werden: Senkung des pH-Wertes bedingt eine Echinozytose, eine Steigerung führt Discozyten in Stomatozyten über. Im physiologischen Plasma-pH-Bereich

spielen derart ausgelöste Formveränderungen der Erythrozyten allerdings keine Rolle.

- (10) Ein sehr häufiges, fast ausschließlich bei Träger-Erythrozyten beobachtetes Artefakt ist die vermehrte Agglutination der Zellen. Andere Artefakte konnten weitgehend vermieden werden.
- (11) Mit der Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Morphologie von Erythrozyten und Träger-Erythrozyten als Parameter für die Membranaktivität bestimmter Substanzen herangezogen werden kann. Es wird deutlich, daß eine Änderung in der Lokalisation des Angriffspunktes einer membranaffinen Substanz, sowie Konzentrationsänderungen solcher Substanzen zu definierten Alterationen der Morphologie von Erythrozyten und Träger-Erythrozyten führen.

Form und Anzahl der bei den Ölsäure-Versuchen beobachtbaren Spicules weichen deutlich von anderweitig provozierten Spicules ab, sodaß prinzipiell auch Rückschlüsse auf die Art der einwirkenden Substanz möglich scheinen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen, D.; Michell, R.H.: "Accumulation of 1,2-Diacylglycerol in the plasma membrane may lead to echinocyte transformation of erythrocytes". Nature (1975); 258: 348-349
2. Bessis, M.: "Red Cell Shapes. An Illustrated Classification and its Rationale". Nouv. Rev. Fr. d'Hémat. (1972); T. 12(6): 721-746
3. Bessis, M.; Weed, R.J.: "Preparation of Red Blood Cells for Scanning Electron Microscopy - A Survey of Various Artifacts". Scanning Electron Microscopy 1972(II); Proceedings of the Workshop on Biological Specimen Preparation Techniques for SEM
4. Billah, M.M.; Finean, J.B.; Coleman, R.; Michell, R.H.: "A Comparison of Haemoglobin-Free Human Erythrocyte 'Ghosts' Prepared under Isoionic and Hypoionic Conditions". Biochem. Soc. Trans. (1977); 5: 1139-1140

5. Bodemann, H.; Passow, H.: "Factors Controlling the Resealing of the Membrane of Human Erythrocyte Ghosts after Hypotonic Hemolysis". J. Membrane Biol. (1972); 8: 1-26
6. Carr, K.E.: "Scanning Electron Microscopy". Histo-pathology (1982); 6(1): 3-24
7. Dale, G.L.; Villacorte, D.G.; Beutler, E.: "High-Yield Entrapment of Proteins into Erythrocytes". Biochem. Med. (1977); 18: 220-225
8. Deloach, J.; Ihler, G.: "A Dialysis Procedure for Loading Erythrocytes with Enzymes and Lipids". Biochim. Biophys. Acta (1977); 496: 136-145
9. Deuticke, B.; Gerlach, E.: "Beeinflussung von Form und Phosphatpermeabilität menschlicher Erythrozyten durch Hämolsine, Benzol-Derivate und pharmakologisch wirksame Substanzen". Klin. Wschr. (1967); Jg.45, Heft 19: 977-983
10. Dewar, C.L.: "Scanning Electron Microscopy of Human Red Blood Cells". Microsc. Acta (1979); 81(3): 209-216

11. Dunn, M.J.: "Red Blood Cell Calcium and Magnesium: Effects upon Sodium and Potassium Transport and Cellular Morphology". *Biochim. Biophys. Acta* (1974); 352: 97-116
12. Geigy, J.R.: "Documenta Geigy", 7. Auflage; Basel 1968
13. Grimes, A.J.: "Human Red Cell Metabolism". Blackwell Scientific Publications; Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1980)
14. Hamilton, W.A.; Sale, A.J.H.: "Effects of High Electric Fields on Micro-Organisms, II". *Biochim. Biophys. Acta* (1967); 148: 789-800
15. Hayes, T.L.; Pease, R.F.W.: "The Scanning Electron Microscope: Principles and Applications in Biology and Medicine". *Adv. Biol. Med. Physics* (1968); 12: 85ff.
16. Dr.Hert GmbH: "Datenblatt Os-8210: Osmium(VIII)-Oxid". München, o.J.

17. Hubbard, A.R.; Sprandel, U.; Chalmers, R.A.: "Dependence of mouse erythrocyte 'ghosts' survival in vivo on cellular ATP concentration". Biochem. Soc. Trans. (1980); 8: 578
18. Ihler, G.M.; Glew, R.H.; Schnure, F.W.: "Enzyme Loading of Erythrocytes". Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1973); 70(9): 2663-2666
19. Palek, J.; Stewart, G.; Lionetti, F.J.: "The Dependence of Shape of Human Erythrocyte Ghosts on Calcium, Magnesium, and Adenosin Triphosphat". Blood (1974); 44(4): 583-597
20. Palek, J.; Church, A.; Fairbanks, G.: "Transmembrane Movements and Distribution of Calcium in Normal and Hemoglobin S Erythrocytes" in Bolis, L.; Hoffman, J.F.; Leaf, A. (eds.): "Membranes and Disease". Raven Press, New York (1976)
21. Ponder, E.: "Red cell Structure and its Breakdown". Springer-Verlag Wien (1955)
22. Rumsby, M.G.; Barnes, Y.W.; Hoare, D.G.: "Studies on the Aging of Human Erythrocytes in vitro". Biochem. Soc. Trans. (1974); 2: 550-552

23. Rumsby, M.G.; Sparrow, S.; Little, C.: "The Oleic Acid-Induced Shape Transformation of Human Erythrocytes". *Biochem. Soc. Trans.* (1979); 7: 922-924
24. Sale, A.J.H.; Hamilton, W.A.: "Effects of High Electric Fields on Micro-Organisms, I". *Biochim. Biophys. Acta* (1967); 148: 781-788
25. Salsbury, A.J.; Clarke, J.A.: "New method for detecting changes in the surface appearance of human red blood cells". *J. clin. Path.* (1967); 20: 603-610
26. Schatzmann, H.J.: "ATP-Dependent Ca^{2+} -Extrusion from Human Red Cells". *Experientia* (1966); XXII(6): 364-365
27. Seeman, Ph.: "Transient Holes in the Erythrocyte Membrane during Hypotonic Hemolysis and Stable Holes in the Membrane after Lysis by Saponin and Lysolecithin". *J. Cell Biology* (1967); 32: 55-70
28. Sheetz, M.P.; Singer, S.J.: "Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1974); 71: 4457-4461

29. Sprandel, U.; Hubbard, A.R.; Chalmers, R.A.: "In vitro Studies on Resealed Erythrocytes Ghosts as Protein Carriers". Res. Exp. Med. (Berl.)(1979); 175: 239-245
30. Sprandel, U.; Hubbard, A.R.; Chalmers, R.A.: "Membrane Transport in Resealed Haemoglobin-Containing Human Erythrocyte 'Ghosts' Prepared by a Dialysis Procedure". Biochem. Biophys. Res. Comm. (1979); 91(1): 79-85
31. Sprandel, U.; Hubbard, A.H.; Chalmers, R.A.: "In Vivo Life Span of Resealed Rabbit Erythrocyte 'Ghosts'". Res. Exp. Med. (Berl.)(1960); 177: 13-17
32. Sprandel, U.; Hubbard, A.R.; Chalmers, R.A.: "Species-specific characteristics of resealed erythrocyte 'ghosts' in vitro". Biochem. Soc. Trans. (1980);
33. Sprandel, U.; Clark, J.B.; Hubbard, A.R.; Chalmers, A.R.: "Morphology of Haemoglobin-Containing Human Erythrocyte 'Ghosts'". Micron (1981); 12: 29-36
34. Sprandel, U.; Hubbard, A.R.; Chalmers, R.A.: "Towards Enzyme Therapy Using Carrier Erythrocytes". J. Inher. Metab. Dis. (1981); 4: 99-100

35. Storon, J.V.; Haley, B.B.; Richards, P.M.: "Human Erythrocytes and Punctured Discs - A Comparison of Membrane Topology". J. Biol. Chem. (1974); 249(15): 5604-5607
36. Watson, L.P. et al.: "Preparation of microscopical specimens for Scanning Electron Microscopy". Scan Electron Microsc. (1970); Pt(2): 45-56
37. Weed, R.J.; Chellsey, B.: "Calcium-pH Interactions in the Production of Shape Change in Erythrocytes". Nouv. Rev. Fr. d'Hémat. (1972); 1. 12(6): 775-782
38. Weed, R.J.; Bessis, M.: "The Discocyte-Reticulocyte Equilibrium of Normal and Pathologic Red Cells". Blood (1973); 41(3): 471-475
39. White, J.G.: "Effects of an Ionophore, A 23187, on the Surface Morphology of Normal Erythrocytes". Am. J. Path. (1974); 77(3): 507-518
40. Zimmermann, U.: Deutsches Patentamt, Offenlegungsschrift 2 326 161 vom 12. 12. 1974

41. Zimmermann, U.; Pilwat, G.; Riemann, F.: "Preparation of Erythrocyte Ghosts by Dielectric Breakdown of the Cell Membrane". Biochim. Biophys. Acta (1975); 375: 209-219
42. Zimmermann, U.; Riemann, F.; Pilwat, G.: "Enzyme Loading of Electrically Homogenous Human Red Blood Cells Prepared by Dielectric Breakdown: . Biochim. Biophys. Acta (1976); 436: 460-474

2. DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas danke ich
Herrn Professor Dr.N.Zöllner,
Vorstand der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-
Maximilians Universität München.

Herrn Privat-Dozent Dr.U.Sprandel bin ich für
hilfreiche Anregungen und wohlwollende Unter-
stützung meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Ich, Thomas Kirschner, wurde am 4.5.1960 als Sohn des Arztes Dr. Herbert Kirschner und seiner Ehefrau Angela, geb. Donker, in Bad Kissingen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule Illertissen trat ich im Herbst 1970 in das Gymnasium (Kolleg der Schulbrüder) in Illertissen ein, das ich im Juni 1979 nach Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife verließ. Danach erfolgte meine Einberufung zur Bundeswehr, die im November 1979 vorübergehend ausgesetzt wurde, da ich die Zulassung zum Studium der Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München erhalten hatte; im November 1985 habe ich das Studium mit Erhalt der Approbation als Arzt abgeschlossen.

